



INSTITUTO  
SUPERIOR DE  
AGRONOMIA  
*Universidade de Lisboa*

**Mafalda Jorge dos Santos**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

## **KOMBUCHA: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS ALIMENTARES PARA USO EM RESTAURAÇÃO**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre  
em Ciências Gastronómicas

Orientador: Prof. Doutora Catarina Prista,  
Professora Auxiliar, ISA/UL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Paulina Mata, Professora Auxiliar, FCT/UNL  
Arguente: Prof. Doutor Manuel Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar, ISA/UL  
Vogal: Prof. Doutora Catarina Prista, Professora Auxiliar, ISA/UL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março 2016**



**Mafalda Jorge dos Santos**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**KOMBUCHA: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E  
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS ALIMENTARES PARA  
USO EM RESTAURAÇÃO**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre  
em Ciências Gastronómicas

Orientador: Prof. Doutora Catarina Prista,  
Professora Auxiliar, ISA/UL

**Março 2016**



***KOMBUCHA: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS  
ALIMENTARES PARA USO EM RESTAURAÇÃO***

Copyright © Mafalda Jorge dos Santos, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



# RESUMO

---

A kombucha é uma bebida fermentada refrescante e agri-doce preparada geralmente com chá preto açucarado ao qual é adicionada a chamada “mãe da kombucha”, uma película de celulose bacteriana contendo um consórcio simbiótico de bactérias acéticas e leveduras. A crescente popularidade da kombucha deve-se essencialmente aos seus alegados efeitos benéficos na saúde humana que, apesar de não terem sido ainda comprovados cientificamente, vários estudos demonstraram o potencial desta bebida em células e organismos-modelo.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a microbiota de culturas de kombucha através do isolamento, seleção e identificação dos microrganismos presentes no líquido fermentado. Foram identificadas as espécies de leveduras *Candida californica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Metschnikowia pulcherrima* e uma bactéria *Acetobacter* sp.. A partir dos microrganismos isolados e de coleção (*Gluconobacter oxydans* CBISA 4270, *Gluconacetobacter hansenii* CBISA 4276 e CBISA 4277, e *Acetobacter aceti* CBISA 4417) tentou-se produzir uma kombucha semelhante à obtida através das culturas iniciais.

Realizou-se também uma prova de análise sensorial com a kombucha produzida com uma das culturas do Laboratório de Bioenergética Microbiana (LBM) do ISA-UL *versus* uma kombucha existente no mercado, com um grupo de 34 provadores não treinados consistido por 16 homens e 18 mulheres com idades compreendidas entre os 18 e 76 anos. Os resultados demonstraram uma forte preferência pela kombucha do LBM, que foi considerada mais doce e mais equilibrada, contudo menos rica em termos aromáticos relativamente à kombucha do mercado, que foi considerada mais ácida.

Com o objetivo de explorar outras aplicações para esta bebida que se está a tornar cada vez mais popular, foram também produzidos outros produtos derivados de kombucha, nomeadamente uma “nata de kombucha” (uma alteração de um produto filipino muito popular) e géis de kombucha.

**Palavras-chave:** Kombucha, Microbiota, Análise Sensorial, Nata de Kombucha, Hidrocolóides, Gastronomia Molecular





# ABSTRACT

---

Kombucha is a refreshing, sweet and acidic fermented beverage usually prepared with sugared black tea to which a “tea fungus” is added. This “tea fungus” is composed of a bacterial cellulosic pellicle containing a symbiotic consortia of acetic bacteria and yeasts. The growing popularity of this fermented beverage is owed to its reported beneficial effects on human health, although these claims haven’t been proved scientifically. Nevertheless, a good number of studies have already demonstrated the potential of this product on cells and model organisms.

In the present study, the microbiota of kombucha cultures was evaluated through the isolation, selection and identification of microorganisms present in the fermented liquid. The yeast species *Candida californica*, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Metschnikowia pulcherrima* were identified as well as one bacteria belonging to the *Acetobacter* genus. The isolated microorganisms were used along with *Gluconobacter oxydans* CBISA 4270, *Gluconacetobacter hansenii* CBISA 4276 and CBISA 4277, and *Acetobacter aceti* CBISA 4417 (ordered from a culture collection) in an attempt to produce a kombucha similar to the one produced with the original cultures.

A sensory evaluation test was performed to assess the acceptability of a kombucha produced with a culture from the Laboratory of Microbial Bioenergetics (LMB) from ISA-UL versus a store-bought kombucha, among a group of 34 untrained testers, comprised of 16 men and 18 women aged between 18 and 76 years. The results showed a strong preference for the LMB kombucha, which was considered sweeter and more balanced, although less rich in aroma compared with the store-bought kombucha, which was considered more acidic.

Alternative applications for this popular beverage were explored and new food products based on kombucha were produced, namely “*nata de kombucha*” (a modification of a popular Philippine product) and kombucha gels.

**Keywords:** Kombucha, Microbiota, Sensory Analysis, *Nata de Kombucha*, Hydrocolloids, Molecular Gastronomy



# ÍNDICE

---

<b>RESUMO</b> .....	<b><i>i</i></b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b><i>iii</i></b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b><i>ix</i></b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b><i>xi</i></b>

---

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 O Chá</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1 História</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.2 Composição Química</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.3 Propriedades e Consumo</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1.4 Preparação</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2 A Kombucha</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.1 História</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.2 Preparação</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.3 Microrganismos Presentes na Kombucha</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.3.1 Leveduras</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.3.2 Bactérias</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2.4 Processos Metabólicos Envolvidos na Produção de Kombucha</b> ....	<b>13</b>
<b>2.2.5 Composição Química</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.6 Propriedades</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.6.1 Propriedades Antimicrobianas</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.6.2 Propriedades Antioxidantes</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2.6.3 Propriedades Anticancerígenas</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.6.4 Outras Propriedades</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.7 Aplicações Alternativas</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.8 Consumo – A Kombucha como um Novo Produto</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 Métodos de Identificação de Microrganismos</b> .....	<b>25</b>

---

2.4	Gastronomia Molecular como Metodologia para Inovação .....	27
2.4.1	Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares .....	28
2.4.2	Hidrocolóides .....	30
2.4.2.1	Agar (E406) .....	30
2.4.2.2	Carrageninas (E407 e E407a) .....	32
2.4.2.3	Goma de Alfarroba (E410) .....	34
2.5	Técnicas de Análise Sensorial .....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
3.1	Obtenção das Culturas de Kombucha .....	37
3.2	Preparação da Base de Chá .....	37
3.3	Seleção e Preparação do Inóculo .....	38
3.4	Preparação de Kombucha .....	38
3.5	Meios de Cultura .....	38
3.6	Isolamento de Microrganismos de Kombucha de Chá Preto .....	39
3.7	Produção de Kombucha a partir de Isolados .....	39
3.8	Técnicas Moleculares de Identificação de Microrganismos .....	40
3.8.1	Extração de DNA .....	40
3.8.1.1	Leveduras .....	40
3.8.1.2	Bactérias Acéticas .....	40
3.8.2	Amplificação de DNA .....	41
3.8.2.1	Leveduras .....	41
3.8.2.2	Bactérias Acéticas .....	42
3.8.3	Quantificação do Produto de PCR .....	43
3.8.4	Sequenciação de DNA .....	43
3.9	Análise Sensorial .....	43
3.10	Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares à base de Kombucha ....	44
3.10.1	Nata de Kombucha .....	44
3.10.2	Filtração de Kombucha .....	44
3.10.3	Géis de Kombucha .....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1	Kombucha .....	47
4.1.1	Seleção e Misturas de Kombucha .....	47
4.1.2	Isolamento de Microrganismos de Kombucha de Chá Preto .....	48
4.1.3	Kombucha Produzida a partir de Isolados .....	48

4.1.4	Identificação dos Microrganismos .....	49
4.1.4.1	Leveduras .....	49
4.1.4.2	Bactérias Acéticas .....	54
4.1.5	Análise Sensorial .....	55
4.2	Novos Produtos Alimentares Obtidos a partir de Kombucha .....	60
4.2.1	Nata de Kombucha .....	60
4.2.2	Géis de Kombucha .....	62
4.2.2.1	Géis com Agar .....	62
4.2.2.2	Géis com Elastic .....	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS .....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
	ANEXOS .....	81
	• Anexo I – Propriedades e Modo de Utilização dos Hidrocolóides Apresentados .....	82
	• Anexo II – Ficha de Prova da Análise Sensorial .....	86
	• Anexo III – Observações Macro e Microscópicas dos Microrganismos Isolados .....	88
	• Anexo IV – Resultados das Sequenciações de DNA Genómico dos Microrganismos Isolados .....	94
	• Anexo V – Resultados da Prova de Análise Sensorial .....	97
	• Anexo VI – Poster das Apresentações do Mestrado de Ciências Gastronómicas, Junho 2015 .....	100



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 2.1</b> Produção de <i>nata de coco</i> .....	20
<b>Figura 2.2</b> Casacos produzidos com “mãe de kombucha”, por Suzanne Lee .....	21
<b>Figura 2.3</b> Tendências de pesquisa globais pelo termo “kombucha”, de 2004 ao presente .....	22
<b>Figura 2.4</b> Health-Ade Kombucha .....	22
<b>Figura 2.5</b> GT’s Kombucha .....	23
<b>Figura 2.6</b> Live Kombucha Soda .....	23
<b>Figura 2.7</b> Reed’s Culture Club Kombucha .....	23
<b>Figura 2.8</b> Wild Kombucha by Ballsy .....	24
<b>Figura 2.9</b> Kombucha da Xaté .....	24
<b>Figura 2.10</b> Esquema da região dos genes de rDNA de fungos .....	25
<b>Figura 2.11</b> Amplificação de DNA por PCR .....	26
<b>Figura 2.12</b> Sequenciação de DNA automatizada .....	27
<b>Figura 2.13</b> Estrutura da molécula de agarose .....	31
<b>Figura 2.14</b> Estruturas das carrageninas principais .....	33
<b>Figura 2.15</b> Estrutura geral de um segmento de galactomanana .....	35
<b>Figura 4.1</b> Perfil eletroforético da amplificação de DNA das leveduras isoladas .....	50
<b>Figura 4.2</b> Alinhamento entre as duas sequências das bandas de 400 pb da amostra da levedura 2 .....	52
<b>Figura 4.3</b> Alinhamento entre sequências dos genes de 18S rDNA de <i>M. pulcherrima</i> e <i>M. bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i> .....	53

<b>Figura 4.4</b> Perfil eletroforético da amplificação de DNA da bactéria 1 .....	<b>55</b>
<b>Figura 4.5</b> Avaliação hedônica das características organoléticas das kombuchas .....	<b>56</b>
<b>Figura 4.6</b> Intensidades dos diferentes atributos referentes ao <u>aroma</u> .....	<b>57</b>
<b>Figura 4.7</b> Intensidades dos diferentes atributos referentes ao <u>sabor</u> .....	<b>58</b>
<b>Figura 4.8</b> Resultado da prova pareada de preferência .....	<b>59</b>
<b>Figura 4.9</b> Intenção de compra das kombuchas apresentadas .....	<b>60</b>
<b>Figura 4.10</b> Película de kombucha cortada aos cubos .....	<b>61</b>
<b>Figura 4.11</b> Alguns exemplos de aplicações de <i>nata de coco</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 4.12</b> Aspetto dos géis de agar .....	<b>62</b>
<b>Figura 4.13</b> Gomas de kombucha com agar .....	<b>63</b>
<b>Figura 4.14</b> Aspetto dos géis de Elastic .....	<b>64</b>
<b>Figura 4.15</b> Véus de kombucha com Elastic .....	<b>64</b>



# ÍNDICE DE TABELAS

---

<b>Tabela 2.1</b> Composição em %(p/p) de peso seco de folhas de chá frescas, de folhas de chá preto e de uma infusão de chá preto (tempo de infusão, 3 min) .....	<b>5</b>
<b>Tabela 2.2</b> Comparação entre os principais componentes de kombucha preparada com chá preto, com diferentes condições de fermentação .....	<b>14</b>
<b>Tabela 2.3</b> Tipos de novos produtos alimentares .....	<b>28</b>
<b>Tabela 3.1</b> Sequências dos <i>primers</i> ITS4 e ITS5 .....	<b>41</b>
<b>Tabela 3.2</b> Mistura reacional para PCR .....	<b>41</b>
<b>Tabela 3.3</b> Programa de PCR utilizado para as leveduras ( <i>primers</i> ITS4 e ITS5) .....	<b>42</b>
<b>Tabela 3.4</b> Sequências dos <i>primers</i> Ac1 e Ac3 .....	<b>42</b>
<b>Tabela 3.5</b> Programa de PCR utilizado para as bactérias acéticas ( <i>primers</i> Ac1 e Ac3) .....	<b>43</b>
<b>Tabela 3.6</b> Composição dos géis de agar preparados .....	<b>45</b>
<b>Tabela 4.1</b> Observações relativas às kombuchas selecionadas .....	<b>47</b>
<b>Tabela 4.2</b> Resultados possíveis da identificação das leveduras isoladas .....	<b>51</b>



## INTRODUÇÃO

---

Nos últimos anos tem-se observado uma crescente preocupação da sociedade em relação à alimentação. Não só relativamente aos aspetos nutricionais dos alimentos, como também da sua proveniência (ex.: se provêm de agricultura biológica ou não) e dos seus efeitos na saúde. Começa-se a observar uma crescente procura por alimentos ditos “saudáveis” e “funcionais”, e assim também surgem novas oportunidades de negócios que se baseiam na venda de bebidas funcionais (referidas como desintoxicantes ou promotoras do sistema imunológico, entre outras propriedades) e produtos alimentares com baixo valor calórico.

A kombucha é uma bebida ancestral, refrescante e agridoce, que consiste em chá fermentado. Desde o seu descobrimento que é conhecida pelas suas propriedades curativas, mas só nesta última década é que se observou uma explosão na sua popularidade, especialmente nos Estados Unidos, onde atualmente existe um mercado bem estabelecido deste produto. Para além da enorme panóplia de marcas de kombucha presentes nas lojas, esta bebida está também presente em estabelecimentos de restauração como um dos vários itens na carta de bebidas, existindo até a possibilidade de pedir kombucha à pressão em alguns desses estabelecimentos.

Em Portugal esta bebida está lentamente a ganhar atenção, nomeadamente em grupos nas redes sociais, onde indivíduos que produzem kombucha em casa, partilham as suas culturas com outros membros do grupo. No mercado, este produto ainda não está muito presente, existindo apenas em lojas especializadas.

Apesar de toda a atenção que a kombucha tem recebido devido às suas propriedades benéficas para a saúde humana, não há provas científicas conclusivas em relação a este aspeto. Contudo foram já feitos vários estudos em organismos-modelo e células, e esta bebida apresenta de facto grande potencial.

Como a kombucha é ainda um produto pouco conhecido em Portugal, é importante a divulgação de informação fundamentada para o público. No âmbito desta dissertação, foram realizadas duas exposições orais para o público geral, uma na Noite Europeia dos Investigadores no contexto da atividade “Diversidade na vinha, no vinho, e nos micróbios dos nossos petiscos”, desenvolvido pelo Centro de Botânica Aplicada à Agricultura (CBAA) do ISA, em Setembro de 2014; e outra no âmbito das apresentações finais da disciplina de Seminários do Mestrado de Ciências Gastronómicas, em Junho de 2015.

Neste trabalho pretendeu-se:

- i.* Caracterizar a microbiota da kombucha;
- ii.* Criação de um inóculo a partir dos microrganismos isolados para a produção desta bebida fermentada;
- iii.* Avaliar a aceitação do público relativamente à kombucha produzida e a existente no mercado, através de testes de análise sensorial;
- iv.* Explorar aplicações alternativas para a kombucha, com recurso a alguns hidrocolóides.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 O Chá

Tanto o chá verde, o oolong e o preto provêm da mesma espécie de planta, *Camelia sinensis*, uma árvore de folha perene da família botânica Theaceae, nativa do Sudeste Asiático [1, 2, 3]. A diferença entre os vários tipos de chá reside no processamento das folhas colhidas. Assim que as folhas são cortadas, a enzima polifenoloxidase, presente no seu interior, é ativada levando à oxidação dos polifenóis. Esta enzima é inativada pelo calor, portanto se as folhas forem submetidas ao calor pouco depois de serem colhidas, há pouca ou nenhuma oxidação e obtém-se o chá verde. Por outro lado, o chá oolong sofre alguma oxidação, enquanto o chá preto é aquele cujo processo de oxidação enzimática é deixado ocorrer durante mais tempo [2, 4].

Existem quatro variedades de *C. sinensis*, mas o chá disponível comercialmente é produzido essencialmente a partir de duas delas, *C. sinensis* var. *assamica* que apresenta folhas largas (utilizada mais frequentemente para chá preto) e *C. sinensis* var. *sinensis* de folhas pequenas (mais utilizada para chá verde) [1].

#### 2.1.1 História

Apesar de a mitologia chinesa apontar para o surgimento do chá como bebida no ano de 2737 a.C. com a lenda de que o chá foi descoberto pelo imperador Shen Nung, as primeiras referências escritas ao chá encontram-se num dicionário chinês de cerca de 400 a.C. [2].

O chá é um produto ancestral que inicialmente era utilizado como erva medicinal e só mais tarde é que se tornou popular como bebida. Esta transição de remédio para bebida

ocorreu no final da Dinastia Zhou (1124 – 222 a.C.) e depois, a partir da Dinastia Qin (221 – 206 a.C.), observou-se um aumento gradual da popularidade do chá. A arte da preparação do chá foi sendo melhorada empiricamente ao longo do tempo de modo a transformar as folhas amargas numa bebida agradável e revigorante. Foi na Dinastia Tang (618 – 907 d.C.) que o chá passou a ter um papel muito relevante no dia-a-dia da sociedade, sendo visto como uma bebida refinada e sofisticada. Tornou-se uma bebida social, presente em todos os eventos importantes das classes sociais mais elevadas. Contudo, continuava a ser consumido pelas classes mais baixas também. A cultura e a popularidade do chá continuaram a evoluir depois da Dinastia Tang. Durante a Dinastia Song (960 – 1279) apareceram as primeiras casas de chá, e na Dinastia Ming (1368 – 1644) foi desenvolvido o chá preto, pois descobriu-se que este tipo de processamento das folhas de chá permitia que este mantivesse a qualidade em viagens longas [5, 6].

Apesar de os portugueses terem sido os primeiros a trazer chá, especiarias e porcelanas do Oriente para o Ocidente, foram os holandeses que trouxeram a cultura do consumo de chá para a Europa, no início do século XVII. Trouxeram também o hábito que o imperador chinês da altura tinha de adicionar quantidades generosas de leite ao seu chá, daí o costume de se adicionar leite ao chá em vários países do Ocidente [6].

O aumento da popularidade do chá no Ocidente (mais especificamente na Inglaterra) deveu-se às influências da princesa portuguesa, Catarina de Bragança, que gostava muito de chá, e quando se casou com Carlos II de Inglaterra, em 1662, trouxe a sua bebida preferida para a corte e daí o chá passou a ser muito popular na sociedade inglesa. Era bebido com leite, como os holandeses tinham “ensinado” e adicionava-se também açúcar [6].

A crescente popularidade do chá levou a que esta bebida fosse incorporada em vários rituais sociais em diferentes países. Atualmente o chá é a bebida mais consumida no mundo a seguir à água [2].

### **2.1.2 Composição Química**

O sabor de uma folha de chá fresca é pouco mais do que amargo e adstringente. Isto deve-se ao facto de os seus principais constituintes (presentes em maior proporção do que os próprios componentes estruturais) serem um conjunto de compostos fenólicos que são amargos e adstringentes, e cujo propósito natural é de tornarem as folhas da árvore do chá desagradáveis para os animais [1, 3].

Aquando do processamento das folhas do chá, ocorrem, de forma geral, dois tipos principais de transformações enzimáticas. Uma delas é a libertação de compostos aromáticos que, na folha do chá intacta, se encontram associados a outras moléculas. Quando as folhas são cortadas ou esmagadas, são libertadas enzimas que quebram estes complexos, havendo então a libertação de aromas [2, 3]. Como as enzimas das folhas no chá verde são inativadas muito cedo, o seu aroma não é tão rico e complexo como os do chá oolong e preto. O segundo tipo de transformação enzimática é a oxidação dos polifenóis pela polifenoloxidase. Esta enzima utiliza o oxigénio do ar para ligar os compostos fenólicos de pequenas dimensões presentes nas folhas do chá, em complexos maiores. As moléculas pequenas que ocorrem naturalmente nas folhas não apresentam cor, mas à medida que são oxidadas em moléculas mais complexas vão apresentando cores cada vez mais escuras [3].

A composição química exata das folhas de chá depende da sua origem, idade e tipo de processamento a que foram submetidas [7]. Por outro lado, a composição das infusões produzidas a partir das folhas de chá vai depender, não só das folhas utilizadas como do tipo de água e do modo de preparação do chá (temperatura da água e tempo de infusão).

A **tabela 2.1** apresenta uma comparação entre os compostos presentes em folhas de chá frescas, de chá preto, e numa infusão de chá preto.

**Tabela 2.1** Composição em %(p/p) de peso seco de folhas de chá frescas, de folhas de chá preto e de uma infusão de chá preto (tempo de infusão, 3 min) (adaptada da referência 7).

Constituintes	Folhas de chá frescas	Folhas de chá preto	Infusão de chá preto
Compostos fenólicos (maioritariamente flavanóis)	30	5	4.5
Compostos fenólicos oxidados (maioritariamente tearubiginas)	0	25	15
Proteínas	15	15	(vestígios)
Aminoácidos	4	4	3.5
Cafeína	4	4	3.2
Fibra	26	26	0
Outros carboidratos	7	7	4
Lípidos	7	7	(vestígios)
Pigmentos (clorofila e carotenóides)	2	2	(vestígios)
Compostos voláteis	0.1	0.1	0.1

Os compostos que têm maior importância nas características organolépticas do chá são os polifenóis que conferem um sabor mais ou menos amargo e a sensação de adstringência. As catequinas, que são compostos fenólicos simples presentes em abundância nas folhas frescas de chá, são amargas e incolores mas não adstringentes. Quando estes compostos sofrem a ação da polifenoloxidase, dão origem a teaflavinas, que apresentam uma cor amarelada ou acobreada e que são muito amargas e adstringentes. Se sofrerem uma ação enzimática mais extensa, formam-se as tearubiginas, mais escuras mas menos amargas e adstringentes [3].

Para além de amargo, o chá é ligeiramente ácido devido à presença de ácidos orgânicos na sua composição [2, 3]. As folhas de chá são também muito ricas em teanina, um aminoácido que é exclusivo do chá. A teanina apresenta um sabor doce e “saboroso” (“*savory*”). Existem muitos compostos que conferem sabor ao chá, mas são mais numerosos os compostos que conferem aroma, tendo sido identificados mais de 630 voláteis no chá [8].

A presença de cafeína no chá é também relevante para o seu consumo, devido aos seus efeitos estimulantes no organismo humano.

### **2.1.3 Propriedades e Consumo**

Na China antiga, o chá era tomado pelas suas propriedades estimulantes, desintoxicantes e medicinais. Acreditavam ser um remédio que auxiliava a eliminação do álcool e toxinas, melhorava a circulação sanguínea e do trato urinário, aliviava dores nas articulações e aumentava a resistência a doenças [9]. Atualmente o chá é ainda consumido como um remédio, sendo muito recomendado pela medicina alternativa.

Devido a estas crenças de que o chá é benéfico para a saúde, têm sido realizados variados estudos científicos com o objetivo de comprovar as propriedades medicinais do chá. Contudo, apesar de não existirem ainda estudos conclusivos acerca dos efeitos no organismo humano, a compreensão da atividade biológica dos componentes do chá é importante para perceber o potencial medicinal desta bebida. As catequinas e os flavonóis (outro grupo de compostos fenólicos) presentes no chá apresentam boa atividade antioxidante, sendo que as catequinas são os antioxidantes mais potentes de todos os compostos fenólicos de origem vegetal [9]. Estes polifenóis apresentam potencial na



prevenção de doenças cardiovasculares [10], cancro [11, 12], diabetes e insuficiência renal [9]. O chá também apresenta atividade antimicrobiana, sendo os polifenóis os principais responsáveis por esta propriedade [5, 13]. A teanina, o aminoácido do chá, demonstrou capacidade de reduzir a pressão arterial, reduzindo a hipertensão em ratos. Este aminoácido tem um efeito relaxante que suprime o efeito estimulante da cafeína também presente no chá [9]. Contudo, ambos os compostos atuam em sinergia promovendo a concentração mental [1]. As propriedades desintoxicantes do chá em relação à metabolização do álcool foram também comprovadas em ratos [9].

É interessante verificar que os antigos conseguiam já perceber as potencialidades do chá como remédio. Apesar de os estudos atuais não comprovarem totalmente os efeitos desta bebida no organismo humano, ela apresenta grande potencial, é um produto rico em termos nutricionais e deve ser consumido como parte de uma dieta saudável.

O chá é consumido por centenas de milhões de pessoas por todo o mundo. O seu consumo está associado não só aos seus potenciais benefícios medicinais, como também ao seu efeito estimulante, à cultura de determinados países ou simplesmente por recreação. Tradicionalmente, no Oriente prefere-se chá verde ou oolong, no Norte de África também se consome chá verde. Na maioria dos restantes países há uma maior preferência por chá preto. Em países de influência inglesa (maioritariamente), ao chá preto costuma-se acrescentar leite e muitas vezes açúcar também. Em muitos outros países bebe-se o chá preto adoçado e acrescenta-se ainda limão. O chá gelado foi introduzido pela primeira vez em 1904 nos Estados Unidos durante um dia muito quente e atualmente é uma maneira de beber chá muito popular em todo o mundo [4].

#### **2.1.4 Preparação**

Para se preparar um bom chá não basta ter em atenção a qualidade das folhas de chá, a água com que se prepara a infusão é igualmente importante. Não se devem utilizar águas duras, pois apresentam altos teores de carbonatos de cálcio e magnésio que vão levar à formação de uma película à superfície do chá, constituída por agregados de compostos fenólicos e carbonatos precipitados. Águas ditas macias levam a uma extração excessiva dos componentes das folhas de chá e conferem um sabor salgado à infusão. A água destilada também não é ideal pois os minerais são essenciais para conferir alguma dimensão ao sabor do produto final. Deve-se, portanto, utilizar uma água com conteúdo

mineral equilibrado e com um pH próximo da neutralidade, de modo a que a infusão tenha um pH final moderadamente ácido (por volta de pH 5) [3].

Caso se utilize água da torneira, os odores e o cloro aí presentes serão maioritariamente eliminados no passo de aquecimento [3]. Para a preparação de chá preto ou oolong, a água deverá estar perto da fervura, enquanto no caso do chá verde a temperatura da água deverá ser mais baixa, por volta dos 77-82 °C [6], de modo a limitar a extração dos compostos amargos e adstringentes muito abundantes neste tipo de chá e minimizar a degradação da clorofila das folhas.

O tempo de infusão é, normalmente, 3 a 5 minutos para o chá preto, fazendo-se apenas uma infusão; para o oolong o tempo é mais curto (90 segundos a 2 minutos) e é possível realizar várias infusões com as mesmas folhas; isto também se aplica ao chá verde, mas o tempo de infusão é de 2 a 3 minutos [6]. Quanto à quantidade de folhas de chá utilizadas, McGee (2004) refere que no Ocidente utiliza-se cerca de 1 a 3 % (p/v) para uma infusão apenas, enquanto no Oriente são utilizadas quantidades maiores de folhas que são deixadas em infusão durante muito pouco tempo e várias vezes seguidas [3].

## 2.2 A Kombucha

A kombucha é uma bebida doce fermentada à base de chá, de origem asiática. Para a produção de kombucha é usado tradicionalmente o chá preto, mas o chá verde também pode ser utilizado como base. Ao chá açucarado é adicionada a chamada “mãe da kombucha” que vai ser responsável pelo processo fermentativo. Esta consiste numa associação simbiótica de bactérias e leveduras, acomodadas numa matriz de celulose sintetizada por bactérias acéticas.

O resultado é uma bebida refrescante, agri-doce e ligeiramente carbonatada, que lembra sidra. O tempo de fermentação é geralmente 7 a 10 dias e, se este for muito prolongado, a kombucha desenvolve um sabor avinagrado mais intenso. As características da kombucha variam muito pois estão dependentes de diversos fatores, tais como o tipo de chá utilizado como base, os microrganismos presentes na “mãe da kombucha” e o tempo de fermentação.

É importante referir que o termo fermentação tem dois significados. No contexto bioquímico, refere-se a todos os processos metabólicos que envolvam a conversão de

compostos orgânicos em energia, na ausência de oxigénio; enquanto no sentido lato, envolve todo o tipo de transformações levadas a cabo por microrganismos e pelas suas enzimas [14].

### **2.2.1 História**

A origem da kombucha é incerta, mas acredita-se que tenha surgido na Manchúria, no nordeste da China [15], sendo que os primeiros registos desta bebida datam de cerca de 221 a.C., onde era conhecida como “o chá da imortalidade” [16]. Em 414 d.C., um médico de nome Kombu teria levado a kombucha da Coreia para o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador Inkyo [9, 15] e surgiria daí o nome “Kombu cha” ou “chá do Kombu” [17, 18].

No início do séc. XX, com a expansão das rotas comerciais, a kombucha veio para o Ocidente pela Mongólia e foi introduzida na Rússia, onde depois seguiu para a Polónia durante a Primeira Guerra Mundial. Depois da guerra, a kombucha já estava presente na Alemanha e Dinamarca [16]. Na altura da Segunda Guerra Mundial, esta bebida já era conhecida em Itália, França e Espanha, mas devido ao racionamento de provisões, nomeadamente de chá e açúcar, neste período de guerra, a kombucha deixou de ser consumida, pois não era possível a sua preparação [15, 16].

Mais tarde, em 1960, investigadores suíços relataram que o consumo de kombucha era tão benéfico como o de iogurte e a partir daí a popularidade desta bebida aumentou [15].

### **2.2.2 Preparação**

Para a produção de kombucha é usado tradicionalmente o chá preto [15], mas também podem ser utilizados outros chás como base. O modo de preparação e as proporções de chá, açúcar e inóculo variam muito de produtor para produtor mas, em traços largos, o procedimento base é o seguinte: prepara-se uma base de chá (0.5 % [p/v], de acordo com Jayabalan *et al.*, 2014 [15]) com 5 a 15 % (p/v) de açúcar [17]. A base de chá é preparada quente, deixada arrefecer e depois distribuída em recipientes limpos de bocal largo. É então adicionado o inóculo composto pela “mãe da kombucha” e 10 a 20 % de kombucha já fermentada [15, 17]. Isto vai provocar uma diminuição do pH do meio, que vai inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejados no chá açucarado. O recipiente onde se pretende produzir a kombucha não deve ser fechado. Deve ser apenas coberto com gaze

limpa para evitar contaminações (moscas, esporos), mas ao mesmo tempo permitir a entrada de ar. É importante que haja algum espaço de cabeça no recipiente para que haja bastante oxigénio disponível.

O preparado é incubado sem agitação, à temperatura ambiente (20 a 22 °C) [15] durante 7 a 10 dias, ou até mais, dependendo do estado do inóculo ou do resultado pretendido. É importante monitorizar frequentemente o chá durante o processo fermentativo até que se atinjam as características desejadas em relação ao aroma e sabor. Quanto mais tempo se deixar o chá a incubar, mais avinagrado ficará o produto final.

Ao fim de alguns dias, uma nova película de celulose (“mãe da kombucha”) ter-se-á formado à superfície do líquido e, caso não seja utilizada para uma nova fermentação, deverá ser guardada no frio, juntamente com algum volume de kombucha já fermentada.

A bebida resultante deverá ser filtrada para remover os restos de celulose e massas de microrganismos em suspensão. Deve ser conservada no frigorífico em recipientes fechados e é geralmente servida fria.

Pode ainda ser realizada uma segunda fermentação para carbonatar a kombucha, adicionando-se uma fonte de açúcar (sumo, fruta, ou açúcar mesmo) à bebida já fermentada. Esta mistura deverá ser guardada numa garrafa de plástico fechada e deixada à temperatura ambiente. A kombucha estará carbonatada assim que a garrafa ficar firme [18].

Quando se prepara kombucha num ambiente caseiro, é necessário ter atenção ao aspeto da kombucha e da respetiva película. Caso a bebida apresente um odor ou coloração anormal, ou se a película apresentar bolor, deverá ser descartada. Devido à acidez do produto final, a kombucha não deve ser preparada nem armazenada em recipientes de cerâmica ou chumbo para que não ocorra lixiviação de compostos tóxicos para a bebida [19, 9].

### **2.2.3 Microrganismos Presentes na Kombucha**

A microbiota da kombucha encontra-se dispersa no líquido e acomodada na “mãe da kombucha”. A “mãe da kombucha” é o nome comum que se dá à película gelatinosa celulósica que se forma à superfície do líquido e que é responsável pela fermentação do chá. Recebe este nome porque é ela que vai dar origem à bebida e a uma nova película, a “filha”. As películas formam-se por camadas, de baixo para cima, sendo que a do topo é

sempre a mais recente [15]. Esta matriz de celulose bacteriana acomoda as bactérias e leveduras responsáveis pela fermentação da kombucha. Estes microrganismos formam uma poderosa associação simbiótica cuja atividade é capaz de inibir o crescimento de potenciais bactérias contaminantes [9].

A composição exata dos microrganismos presentes na kombucha é variável, estando dependente da sua origem [15].

### **2.2.3.1 Leveduras**

As leveduras que já foram isoladas de kombucha pertencem a várias espécies e maioritariamente aos seguintes géneros: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera*/ *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorula* e *Mycoderma* [15].

Mayser *et al.* (1995) analisaram 34 películas de kombucha de diferentes origens (maioritariamente da Alemanha) e isolaram leveduras do género *Brettanomyces*, nomeadamente *B. lambicus* em 56% das amostras, e dos géneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* em 29% e 26%, respetivamente. Também foram isoladas as espécies *Saccharomycodes ludwigii* e *Candida kefir*, mas apenas em uma amostra, cada. Algumas amostras apresentavam leveduras apiculadas dos géneros *Kloeckera* e *Hanseniaspora* e leveduras formadoras de película como *Candida krusei* e *Issatchenkia occidentalis/orientalis* [20].

Outros investigadores estudaram culturas de kombucha de origem australiana, de onde isolaram leveduras das espécies *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulospora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Brettanomyces bruxellensis* e *Candida stellata*. Estas espécies foram as mais predominantes entre todos os isolados obtidos das culturas analisadas [21].

Marsh e colaboradores (2014) analisaram culturas de kombucha do Canadá, Reino Unido, Irlanda e Estados Unidos e verificaram que o género *Zygosaccharomyces* era predominante, tendo sido identificadas duas espécies desta população: *Z. lentus* e *Z. bisporus*. Do género *Dekkera* foram identificadas *D. bruxellensis* e *D. anomala*; e do género *Pichia* e similares, *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, *P. membranaefaciens* e *Hyphopichia burtonii*. Foi também detetada a presença de *Kazachstania unispora*, *Davidiella tassiana*, *Lachancea fermentati*, *Kluyveromyces marxianus*, *Naumovozyma castelli*, *Wallemia sebi* e

*Leucosporidiella fragaria*, espécies que até então não tinham sido ainda associadas à kombucha [22]. Já em culturas provenientes da Arábia Saudita, isolaram-se e identificaram-se *Candida guilliermondii*, *C. colleculosa*, *C. kefir*, *C. krusei* e, possivelmente, *Saccharomyces ludwigii* [23].

Kurtzman *et al.* (2001) descrevem no seu trabalho uma nova espécie de levedura, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, que foi isolada de kombucha [24].

Foram identificadas várias espécies dos gêneros *Saccharomyces* e *Candida*, tais como *S. cerevisiae*, *S. bisporus*, *C. famata* e *C. obtusa*. *Zygosaccharomyces rouxii*, *Brettanomyces intermedius*, *B. claussenii*, *B. custersii*, *Kloeckera apiculata* e *Kuyveromyces africanus* também foram referidas como presentes em kombucha [9, 15].

Apesar de não existir um conjunto universal de leveduras presentes na kombucha, as leveduras osmotolerantes, fermentativas e produtoras de ácido encontram-se entre os isolados mais comuns [21].

### 2.2.3.2 Bactérias

As bactérias predominantes na kombucha são as acéticas. Pertencem essencialmente aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* [9, 15, 22], sendo a bactéria mais relevante a *Gluconacetobacter xylinus*/*Komagataeibacter xylinus* (anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*) [22, 25], pois é a responsável pela produção da película de celulose que forma a chamada “mãe da kombucha”. *A. xylinoides*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Bacterium gluconicum* e *Gluconobacter oxydans* também ocorrem com frequência nas culturas de kombucha [9, 15]. Para além destas, foram isoladas outras bactérias, tais como *A. intermedius* [26] e bactérias fixadoras de azoto como *A. nitrogenifigens* e *Gluconacetobacter kombucha*, sendo esta última capaz de produzir celulose [27, 28].

Marsh *et al.* (2014) investigaram a população bacteriana de várias culturas de kombucha de diferentes origens e verificaram que os gêneros de bactérias dominantes nas amostras analisadas eram *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*, sendo que este último era predominante. Também foram detetadas bactérias lácticas *Lactobacillus* e *Lactococcus*, sendo os lactobacilli mais comuns possivelmente *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. Outros gêneros de bactérias observados neste estudo (mas com menor ocorrência que os anteriores) foram, *Leuconostoc*, *Allobaculum*, *Ruminococcaceae Incertae Sedis*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Thermus*. É possível que algumas

destas bactérias tenham sido introduzidas por condições de saneamento deficientes na origem das culturas [22].

#### 2.2.4 Processos Metabólicos Envolvidos na Produção de Kombucha

As leveduras e as bactérias da kombucha utilizam os substratos das suas atividades metabólicas de forma complementar. As leveduras hidrolisam a sacarose (açúcar) da base de chá em frutose e glucose pela ação da enzima invertase, e produzem etanol e dióxido de carbono [15], sendo que algumas delas, como as do género *Saccharomyces* tem preferência por glucose, ao passo que determinadas leveduras do género *Zygosaccharomyces* têm preferência por frutose como substrato [29]. As bactérias acéticas convertem a glucose em ácido glucónico e a frutose em ácido acético [30]. A presença deste ácido estimula as leveduras a produzir etanol que depois é utilizado pelas bactérias acéticas para o seu crescimento e para a produção de mais ácido acético [30, 31]. Tanto o etanol como o ácido acético apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas, o que significa que o ambiente fermentativo da kombucha tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes [9].

A bactéria *Gluconacetobacter xylinus* é a principal responsável pela síntese da matriz de celulose que acomoda a microbiota da kombucha, promovendo assim a associação entre as bactérias e leveduras. A cafeína e outras substâncias estimulantes similares presentes no chá estimulam a síntese de celulose bacteriana [9].

Leveduras dos géneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* produzem compostos aromáticos frutados, apresentando uma grande importância no desenvolvimento do aroma da kombucha. As leveduras apiculadas (*Kloeckera* e *Hanseniaspora*) sintetizam ésteres voláteis e ácidos que conferem ao substrato um aroma semelhante a sidra [20].

O pH da kombucha vai decrescendo ao longo do processo fermentativo devido à produção de ácidos orgânicos. A cor do líquido vai ficando mais clara, em relação à cor original do chá, devido às alterações que ocorrem na conformação dos complexos fenólicos perante o aumento da concentração de protões [3], e também devido à ação de enzimas microbianas sobre os polifenóis [15, 32].

### 2.2.5 Composição Química

A composição química da kombucha é muito variável, estando dependente de vários fatores como a duração da fermentação, o tipo de microrganismos presentes no inóculo e as características da base de chá (água utilizada, tipo e concentração de chá e de açúcar).

A kombucha contém vários tipos de ácidos orgânicos tais como, acético, glucônico, glucurônico, cítrico, láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínico, pirúvico, úsnico. Também contém açúcares, nomeadamente sacarose, glucose e frutose; vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e C; glicerol, aminoácidos, aminas biogénicas, purinas, pigmentos, lípidos, proteínas, algumas enzimas hidrolíticas, etanol, compostos com propriedades antibióticas, dióxido de carbono, compostos fenólicos, minerais, DSL (*D-saccharic acid-1,4-lactone*) e outros metabolitos microbianos [9, 15].

A **tabela 2.2** lista os principais componentes da kombucha e respectivas concentrações observadas em vários trabalhos realizados com esta bebida, com diferentes condições de fermentação.

**Tabela 2.2** Comparação entre os principais componentes de kombucha preparada com chá preto, com diferentes condições de fermentação (adaptada da referência 15). Valores aproximados.

Componente	Concentração (%[p/v])	Sacarose inicial (%)	Quantidade de chá preto	Temperatura de fermentação (°C)	Tempo de fermentação (dias)	Referência
	0.8	10	2 saquetas	24 ± 3	60	[30]
Ácido acético	0.5	10	1.2% (p/v)	24 ± 3	18	[32]
	0.2	5				
	0.3	7	0.5% (p/v)	20	25	[33]
	0.1	10				
Ácido glucónico	3.9	10	2 saquetas	24 ± 3	60	[30]
	1.3	5				
	3.1	7	0.5% (p/v)	20	25	[33]
	3.6	10				
Ácido glucurónico	0.2	10	1.2% (p/v)	24 ± 3	18	[32]
Frutose	5.5	10	2 saquetas	24 ± 3	60	[30]
	0.5	7	0.15% (p/v)	28	21	[34]
Glucose	1.2	10	2 saquetas	24 ± 3	60	[30]



	1.3	7	0.15% (p/v)	28	21	[34]
	1.1	10	2 saquetas	24 ± 3	60	[30]
<b>Sacarose remanescente</b>	1.3	7	0.15% (p/v)	28	21	[34]
	0.1	5				
	0.2	7	0.5% (p/v)	20	25	[33]
	0.3	10				

O sabor agridoce da kombucha advém da presença destes ácidos orgânicos e açúcares na sua composição.

Nutricionalmente, a “mãe da kombucha” é constituída maioritariamente por proteína e fibra. É rica em aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo a lisina o que ocorre em concentrações mais altas, segundo a análise realizada por Jayabalan e colaboradores (2010) [35].

## 2.2.6 Propriedades

A kombucha já era conhecida na antiguidade pelas suas propriedades curativas. Apesar de não existirem ainda provas científicas sólidas sobre os efeitos da kombucha na saúde humana, os consumidores desta bebida têm referido que esta alivia dores de cabeça, tem propriedades desintoxicantes, reduz o nível de colesterol, promove o bom funcionamento do fígado, previne problemas digestivos e circulatórios, aumenta a resistência ao cancro, retarda o envelhecimento, melhora o metabolismo e a visão, diminui a incidência de inflamações, entre outros efeitos [9, 15].

### 2.2.6.1 Propriedades Antimicrobianas

Atualmente foram já realizados vários estudos acerca das propriedades da kombucha em modelos experimentais. Quanto às suas propriedades antimicrobianas, Steinkraus e colaboradores (1996) verificaram que a bebida fermentada inibia o crescimento das bactérias patogénicas *Helicobacter pylori* (principal causa de gastrite relacionada com úlceras pépticas e cancro do estômago), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Agrobacterium tumefaciens*. Contudo os resultados foram semelhantes à inibição por vinagre, o que significa que a atividade inibitória da kombucha sobre estas bactérias deve-se essencialmente ao ácido acético presente na sua composição [36]. O estudo realizado

por Sreeramulu *et al.* (2000) testou o efeito da kombucha em culturas dos microrganismos patogênicos *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *H. pylori* e *Candida albicans*, e verificou-se que, na maior parte dos casos, havia maior inibição do crescimento destes microrganismos com amostras de kombucha fermentadas durante mais tempo. Apesar do poder antimicrobiano ser comparável ao do ácido acético (com exceção em *C. albicans*), a kombucha também apresentou ação inibitória no crescimento de *E. coli*, *Sl. typhimurium*, *Sl. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *Sh. sonnei*, *Cm. jejuni* e *C. albicans* mesmo com pH neutro, e com tratamento térmico, o que quer dizer que o ácido não é o único responsável pelo poder antimicrobiano da kombucha. Isto implica a existência de outros compostos com ação antimicrobiana na composição da bebida fermentada que não sejam proteínas (pois não resistiriam ao tratamento térmico), nem catequinas (compostos fenólicos presentes em abundância no chá), dado que as amostras de chá não fermentado não apresentaram ação inibitória para nenhum dos microrganismos com exceção de *Cm. Jejuni* [37]. Battikh e colaboradores (2013) estudaram a atividade antimicrobiana de kombucha preparada com chá preto e com chá verde, e verificaram que, apesar de ambas inibirem o crescimento da maior parte dos microrganismos estudados, a kombucha de chá verde apresentou maior potencial antimicrobiano [38].

### 2.2.6.2 Propriedades Antioxidantes

A atividade antioxidante está relacionada com a prevenção de cancros, aumento da imunidade e alívio de inflamações e artrite. A kombucha apresenta maior atividade que chá não fermentado. Isto está associado ao conteúdo de polifenóis, ácido ascórbico e DSL da bebida fermentada. As propriedades antioxidantes da kombucha dependem do tempo de fermentação, tipo de chá utilizado e dos microrganismos presentes [15].

Chu e Chen (2006) verificaram que as kombuchas estudadas apresentavam atividade sequestradora de DPPH ( $\alpha,\alpha$ -difetil- $\beta$ -picrilhidrazil) e do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) cerca de 1.7 e 1.4 vezes superior ao do chá não fermentado, respetivamente. Também foi avaliada a taxa de inibição da peroxidação do ácido linoleico, em que as kombuchas apresentaram, em média, valores cerca de 1.4 vezes superiores ao do controlo. Estas propriedades antioxidantes observadas nas amostras de kombucha aumentaram com o tempo de fermentação, contudo não se recomenda a

fermentação prolongada do chá devido à formação excessiva de ácidos orgânicos fracos. No entanto, os perfis de atividade antioxidante apresentaram algumas variações entre amostras, o que poderá estar relacionado com as diferentes origens das culturas de kombucha [39]. Jayabalan *et al.* (2008) estudaram as propriedades de kombucha preparada com chá preto, verde, e com resíduos provenientes do processamento de chá (*tea waste material*), verificando igualmente que todas as amostras apresentaram um aumento da capacidade sequestradora de DPPH, mas kombucha de chá verde demonstrou maior atividade. O mesmo foi observado em relação à inibição da peroxidação do ácido linoleico. Verificou-se também que todos os tipos de kombucha apresentaram um aumento da atividade sequestradora de aniões superóxido com o tempo de fermentação, contudo o inverso foi observado para radicais hidroxilo [40]. No trabalho de Malbaša e colaboradores (2011), foi avaliada a influência de três culturas diferentes (mistura de bactérias acéticas e *Zygosaccharomyces sp.*, mistura de bactérias acéticas e *Saccharomyces cerevisiae*, e uma cultura de kombucha local) nas propriedades antioxidantes de kombucha de chá preto e verde contra radicais hidroxilo e DPPH. Os autores verificaram que a kombucha de chá preto produzida com a mistura contendo *Zygosaccharomyces sp.*, e a de chá verde produzida com a cultura local demonstraram maior atividade antioxidante [41].

Existem estudos que comprovam a atividade da kombucha como agente hepatoprotetor, atuando contra a hepatotoxicidade do tetracloreto de carbono em ratos (tanto como um agente preventivo, como curativo) [42]; contra a citotoxicidade e morte celular induzida por TBHP (ter-butil hidroperóxido) em hepatócitos de ratos [43]. Estas propriedades desintoxicantes da kombucha devem-se, possivelmente, aos compostos com atividade antioxidante presentes na sua composição. Wang *et al.* (2013) reportaram que o DSL (composto que é produzido essencialmente por *Gluconacetobacter sp.* A4 presente na kombucha) é o principal responsável pelos efeitos hepatoprotetores da bebida fermentada. Neste estudo testou-se o efeito de DSL, de kombucha tradicional e de kombucha fermentada apenas com *Gluconacetobacter sp.* A4, contra hepatotoxicidade induzida por paracetamol em ratos e verificou-se que os efeitos de ambas as bebidas foram semelhantes ao do DSL em termos de atividade hepatoprotetora [44].

### 2.2.6.3 Propriedades Anticancerígenas

As propriedades anticancerígenas da kombucha também foram investigadas. Jayabalan e colaboradores (2011) estudaram as propriedades citotóxicas e anti-invasivas de frações de kombucha extraídas por diferentes solventes, contra células cancerígenas A549

(carcinoma pulmonar humano), U2OS (osteossarcoma humano) e 786-O (carcinoma renal humano). A fração extraída por acetato de etilo foi a mais eficaz e foi determinado que esta continha malonato de dimetil 2-(2-hidroxi-2-metoxipropilideno) e vitexina, que possivelmente serão os compostos responsáveis pelas propriedades anticancerígenas da kombucha [45]. Srihari *et al.* (2013) testaram o efeito de extrato de kombucha liofilizado contra células PC-3 (câncer da próstata). O extrato foi conseguido através de acetato de etilo. Verificou-se que a kombucha diminuiu significativamente a sobrevivência das células cancerosas através da inibição da expressão de moléculas que estimulam a angiogênese. Também se observou uma inibição na migração das células do câncer da próstata [46].

### 2.2.6.4 Outras Propriedades

Para além das propriedades anteriormente referidas, outros autores têm reportado outros efeitos benéficos da kombucha. Shenoy (2000) observou atividade hipoglicémica de kombucha em ratos normais e em indivíduos com diabetes induzido por aloxana [47]. Por outro lado, Hartmann *et al.* (2000) forneceram uma solução de kombucha a um grupo de ratos (vs. um grupo controlo ao qual foi fornecida água) durante o seu desenvolvimento até à sua morte natural. Os autores verificaram que a ingestão crónica de kombucha provocou uma inibição no aumento de peso, aumentou a resposta e percepção de estímulos ambientais, e contribuiu para um aumento da longevidade nos indivíduos estudados. Contudo observou-se um aumento do tamanho dos fígados e baços nos ratos tratados com kombucha [48]. Yang e colaboradores (2008) verificaram os efeitos antioxidantes e hipocolesterolémicos da kombucha em ratos, e também observaram uma diminuição do peso dos indivíduos tratados com a bebida fermentada [49]. Num estudo realizado por Kallel *et al.* (2012), observou-se uma inibição da  $\alpha$ -amilase pancreática suína por kombucha, em testes *in vitro*. Um copo de 200 mL da bebida poderá ter algum efeito inibidor da  $\alpha$ -amilase no intestino delgado, afetando a digestão de amido e glucose absorvida. Estes resultados poderão dar indicações acerca da ação da kombucha na perda de peso e tratamento da diabetes tipo 2 [50].

A kombucha é considerada um potencial produto probiótico desde que não sofra nenhum processamento que remova ou inviabilize os microrganismos presentes. Um produto probiótico é aquele que contém microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios na saúde do indivíduo. Exemplos deste tipo de produtos são iogurtes, leite fermentado e não fermentado, miso, tempeh e alguns sumos ou outras bebidas fermentadas [51].

Apesar destes potenciais benefícios da kombucha, foram também reportados casos de indivíduos que se sentiram indispostos após o consumo desta bebida. Os Centros de Controlo e Prevenção de Doenças (EUA) registam dois casos de indivíduos que ficaram inexplicavelmente doentes após consumo regular de kombucha, tendo um dos indivíduos falecido [52]. Srinivasan *et al.* (1997) reportam quatro casos de doenças associadas ao consumo de kombucha. Dois dos pacientes demonstraram sintomas de reação alérgica, outro icterícia e o restante náuseas, vômitos, e dores de cabeça e pescoço [19]. Adicionalmente, Kole e colaboradores (2009) relatam um caso de um indivíduo com HIV que foi admitido com hipertermia severa, acidose láctica e falha renal aguda 15 horas depois do consumo de uma garrafa de kombucha [53]. É importante referir que estes relatos envolvem casos singulares e separados, e não é possível definir com certeza de que o consumo de kombucha foi o principal responsável pelos efeitos secundários descritos.

### 2.2.7 Aplicações Alternativas

A kombucha é consumida quer como refresco, quer como tónico, devido aos seus supostos efeitos benéficos. Para além da aplicação da cultura de kombucha para a fermentação de chá, foram testados outros substratos para a produção de bebidas diferentes. Cvetković e Markov (2002) utilizaram uma solução de extrato de malte (10% [p/v]) e chá preto (0.2% [p/v]) como base, produzindo uma bebida sensorialmente satisfatória [54]. Outros autores testaram leite magro e meio gordo com diferentes concentrações de inóculo e verificaram que as combinações com leite meio gordo eram mais agradáveis. Dentro destas, a mistura com 15 % (v/v) de inóculo foi a que se destacou [55]. Malbaša e colaboradores (2009) produziram várias bebidas à base de leite meio gordo e kombucha de várias origens (de chá preto, verde e de extrato de tupinambo), que foram comparadas com iogurte, tendo na maioria dos casos conseguido bebidas agradáveis e com melhor estabilidade no armazenamento [56].

A película de celulose bacteriana que constitui a “mãe da kombucha” também poderá ser aproveitada para outras aplicações. Czaja *et al.* (2006) reportam a potencialidade da utilização da película de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no tratamento de lesões dérmicas [57]. Nas Filipinas, a película de celulose bacteriana resultante da fermentação de água de coco ou sumo de ananás (ou outras frutas) é cortada em cubos e denominada “nata” (figura 2.1). Este é um produto bastante popular, sendo utilizado em sobremesas e refrescos. No presente trabalho, a “mãe da kombucha” foi utilizada para a produção de “nata de kombucha” (ver secção 3.9.1).



**Figura 2.1** Produção *nata de coco* (imagem retirada da referência 58). Camadas espessas de celulose bacteriana resultante da fermentação de água de coco por *A. xylinum* são cortadas em cubos uniformes para a produção da chamada “*nata de coco*”.

Murugesan *et al.* (2006), Mamisahebei *et al.* (2007) e Šćiban *et al.* (2012) testaram a película de celulose da kombucha na remoção de poluentes metálicos de soluções aquosas e verificaram que esta é um bioabsorvente bastante eficaz, apresentando a potencialidade de ser utilizada em projetos de tratamento de águas contaminadas [59, 60, 61]. Zhu e colaboradores (2014) estudaram a biocompatibilidade desta estrutura e verificaram que esta é um biomaterial promissor para a engenharia de tecido nervoso [62].

Murugesan *et al.* (2005) estudaram a utilização da “mãe da kombucha” como suplemento na alimentação de pintos *broiler* e verificaram que uma concentração de 15 % (p/p) de película em ração, provocou um aumento do consumo de ração e água, do peso e do fator de produção das aves, sem ter sido observado qualquer efeito secundário negativo [63].

Suzanne Lee [64], uma *designer* de moda nova-iorquina e fundadora da Biocouture (<http://www.biocouture.co.uk/>), um projeto cujo objetivo é o da criação de peças de roupa a partir de biomateriais, produziu peças de vestuário a partir de películas de kombucha desidratadas de grandes dimensões, que foram lavadas, secas, cortadas e cosidas como se fossem pedaços de tecido (figura 2.2). Este projeto foi apresentado numa TED Talk [65], onde Lee usou um colete feito com “mãe de kombucha”. O único grande inconveniente destas roupas é o facto de as películas absorverem água, pelo que estas peças de vestuário inchariam com a chuva e, eventualmente, começariam a desfazer-se nas costuras.

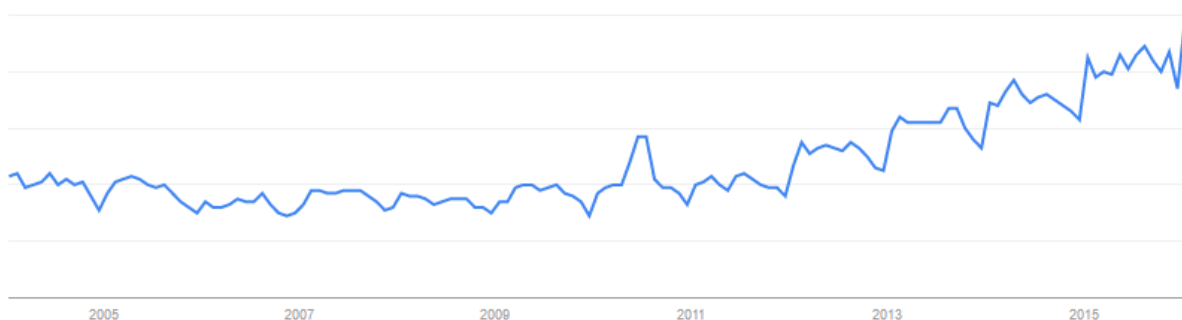


**Figura 2.2** Casacos produzidos com “mãe de kombucha”, por Suzanne Lee (imagem retirada da referência 66). É possível tingir as peças de vestuário produzidas com as películas desidratadas com corantes vegetais, criando padrões orgânicos (esquerda) ou com índigo (direita) que tem propriedades antimicrobianas.

### 2.2.8 Consumo – A Kombucha como um Novo Produto

A kombucha tornou-se uma bebida muito popular nestes últimos anos devido aos seus potenciais efeitos benéficos. Numa sociedade cada vez mais preocupada com a sua alimentação e com os benefícios dos alimentos que consome, é natural que esta bebida tenha sido tão bem recebida.

De acordo com o Google Trends (<https://www.google.com/trends/>), a secção do Google que avalia as tendências de pesquisa dos utilizadores deste motor de busca, o interesse pelo termo “kombucha” tem aumentado desde 2010 (**figura 2.3**), sendo que o país onde este termo é mais pesquisado é os EUA, seguido pela Nova Zelândia e o Canadá. Em termos de pesquisas relacionadas, os tópicos mais procurados (sem incluir a bebida em si) são os benefícios, receitas, o modo de preparação e a cultura de kombucha [67].



**Figura 2.3** Tendências de pesquisa globais pelo termo “kombucha”, de 2004 ao presente [67]. Os pontos marcados no gráfico são relativos ao ponto mais alto, que representa 100% das pesquisas por este termo.

A kombucha é um produto extremamente popular nos EUA, sendo que existem inúmeras marcas desta bebida disponíveis no mercado (exemplos nas **figuras 2.4 a 2.7**), algumas delas representando um volume de negócios considerável [68]. De acordo com a Quartz (<http://qz.com/>), um jornal de negócios digital, só no ano 2014 foram consumidos o equivalente a quase 400 milhões de dólares em kombucha [68]. Devido ao grande número de marcas existentes no mercado, os produtores procuram inovar o seu produto introduzindo kombuchas com sabores ou combinações pouco usuais e uma imagem atrativa que permita a diferenciação do seu produto em relação ao da concorrência [69].



**Figura 2.4** Health-Ade Kombucha, de Los Angeles, Califórnia (imagem retirada da referência 70). Disponível nos sabores (da esquerda para a direita): uvas da Califórnia, maçã Pink Lady, ameixa, romã, original, gengibre e limão, lima + gengibre + pimenta cayenne, beterraba e cenoura. O nome da marca e a embalagem que lembra um frasco de remédio, apelam aos potenciais benefícios da kombucha para a saúde. O objetivo da embalagem escura é na realidade para proteger o produto da luz, mas acaba por se aliar também à imagem de bebida saudável que a marca pretende transmitir.





**Figura 2.5** GT's Kombucha, da Califórnia (imagem retirada da referência 71). Esta marca dispõe de duas linhas, a *Classic* com teor alcoólico superior a 0.5 %, e a *Enlightened* com teor alcoólico inferior a 0.5 %. Esta marca possui um total de 32 sabores de kombucha, contando com sabores de fruta, herbais e alguns com sementes de chia. A imagem do produto, com imagens que lembram mandalas, os nomes místicos e a constante utilização da palavra “elixir” na descrição no site (<http://synergydrinks.com/>) apela à origem asiática, anciã e esotérica desta bebida.



**Figura 2.6** Live Kombucha Soda, de Austin, Texas (imagem retirada da referência 72). Esta marca, ao contrário das anteriores, apresenta a kombucha como um refrigerante, portanto dispõe de sabores que tentam imitar os de refrigerantes populares. Da esquerda para a direita: mirtilos e romã; *cream soda* e laranja; *rootbeer* e baunilha; lima e limão; especiarias; gengibre; *Cola*; morango e ruibarbo.



**Figura 2.7** Reed's Culture Club Kombucha (imagem retirada da referência 73). Disponível nos sabores (da esquerda para a direita): goji e gengibre; hibiscos, gengibre e toranja; limão, gengibre e framboesa; oxicoço e gengibre; romã e gengibre; água de côco e lima; maracujá, manga e gengibre; uva Cabernet Sauvignon.

Em alguns países existem “bares” de kombucha, onde é servida kombucha à pressão. Alguns exemplos são o Red Star Kombucha, nos EUA; e o Wild Kombucha by Ballsy (<http://wildkombucha.com/>), na Austrália (figura 2.8).



**Figura 2.8** Wild Kombucha by Ballsy, em Sidney, Austrália (imagem retirada da referência 74).

Em Portugal esta bebida não é tão popular e ainda não é muito conhecida, exceto em grupos específicos, mas já existem páginas de partilha de kombucha espalhadas pelas



**Figura 2.9** Kombucha da Xaté (imagem retirada da referência 75).

redes sociais, como é o caso do grupo “Kefir e Kombucha Portugal - GRUPO DE PARTILHA”, no Facebook (<https://www.facebook.com/groups/212887238773306/>), onde os participantes trocam culturas entre si, discutem o progresso dos alimentos fermentados que produzem e partilham receitas.

A kombucha está presente no mercado em vários países e em Portugal pode-se encontrar em lojas de produtos biológicos/naturais, como as do Celeiro, na Miosóti e nos supermercados do El Corte Inglés. Uma das marcas existentes chama-se Xaté (Cantanhede, Portugal) e existe nos sabores: original, romã e limão (figura 2.9).

## 2.3 Métodos de Identificação de Microrganismos

Existem vários métodos que podem ser usados para determinar os principais grupos de microrganismos que compõem a microbiota interveniente na produção de kombucha. Para além dos métodos mais clássicos baseados no crescimento dos microrganismos em meios seletivos e que dependem da capacidade de multiplicação destes nas condições selecionadas, atualmente os métodos mais fiáveis são os moleculares, que têm por base reações de amplificação de regiões específicas do DNA por PCR utilizando sequências iniciadoras (*primers*) desenhadas de acordo com as regiões que se pretende amplificar. Para a identificação de espécies de leveduras são geralmente amplificadas regiões do DNA ribossomal (rDNA), que apresentam várias regiões conservadas separadas por domínios com sequências específicas das respetivas espécies. O rDNA é constituído pelos genes que codificam as subunidades 18S, 5.8S e 25/28S, separados pelos espaçadores transcritos internos (*internal transcribed spacers* ou ITS) ITS1 e ITS2 [76], tal como mostra a **figura 2.10**.

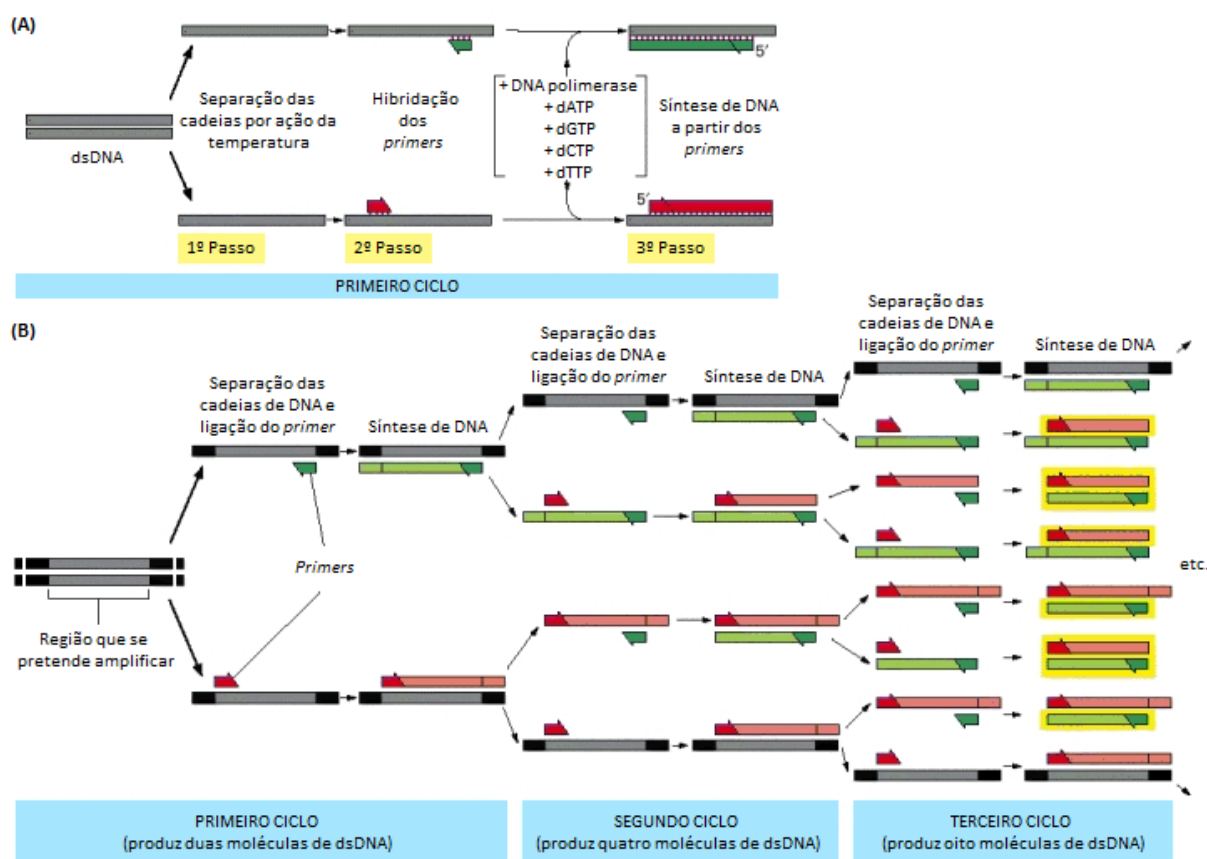


**Figura 2.10** Esquema da região dos genes de rDNA de fungos (adaptado das referências 76 e 77). As caixas representam os genes ribossomais e as setas coloridas indicam as posições dos *primers* utilizados neste trabalho para a identificação de espécies de leveduras (ITS4 e ITS5).

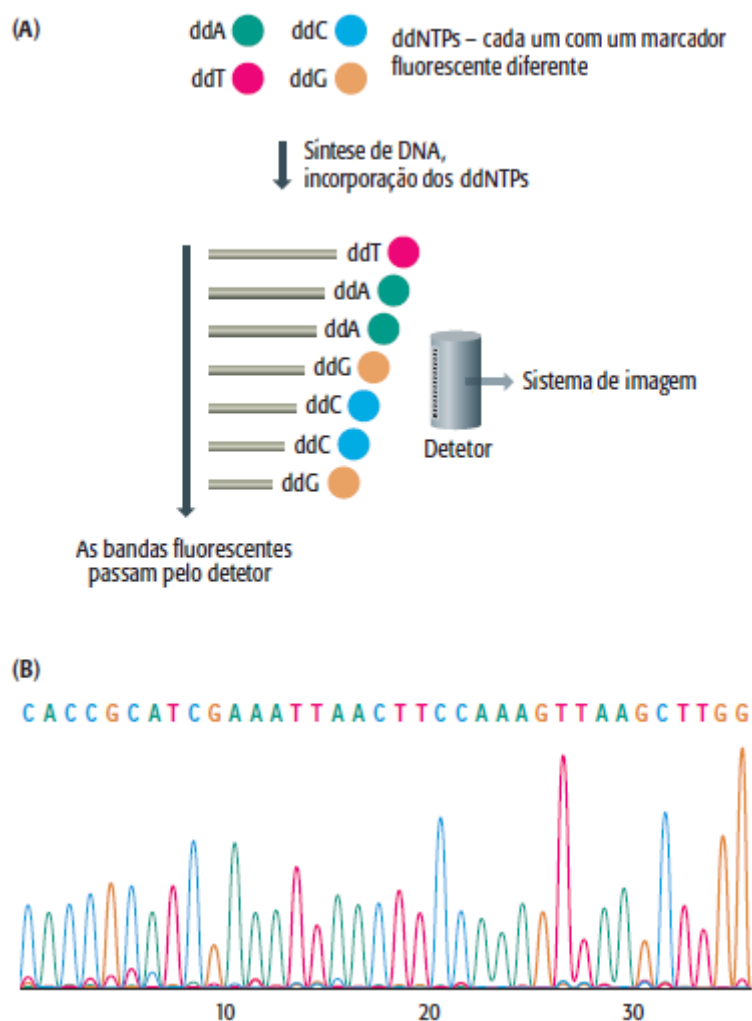
Para a identificação de espécies de bactérias acéticas são utilizados os *primers* Ac1 e Ac3. Estes correspondem a regiões conservadas do rDNA bacteriano e são utilizados para amplificar parte do gene de 16S rDNA [78].

A técnica de PCR compreende três passos fundamentais (representados na **figura 2.11**), a desnaturação do DNA, onde as cadeias que compõem o dsDNA são separadas pela rutura das pontes de hidrogénio que as unem pela ação da temperatura (94 a 95 °C); o passo de *annealing*, em que ocorre a ligação dos *primers* aos moldes de ssDNA, a uma temperatura mais baixa; e finalmente, o passo de extensão, que se dá à temperatura ótima da DNA polimerase utilizada, e onde ocorre a síntese de DNA catalisada por essa enzima [79].

Os resultados da amplificação das regiões específicas por PCR são geralmente analisados por eletroforese em gel de agarose e posteriormente sequencia-se o produto de PCR por sequenciação automática de DNA (*automated DNA sequencing*), uma técnica baseada no método de sequenciação de Sanger (**figura 2.12 A**) [80].



**Figura 2.11 Amplificação de DNA por PCR** (adaptado da referência 80). (A) Os três passos fundamentais de um PCR. (B) Estes passos são repetidos durante vários ciclos para que se consigam várias cópias do segmento de DNA desejado. Os fragmentos assinalados a amarelo são aqueles cujo tamanho corresponde ao da região que se pretende amplificar, os outros fragmentos apresentam ainda DNA extra a jusante da sequência original. Este fenómeno acontece apenas nos primeiros ciclos. Após vários ciclos, todos os fragmentos apresentarão o tamanho desejado.



**Figura 2.12 Sequencição de DNA automatizada** (adaptado da referência 81). (A) Cada ddNTP (nucleósidos modificados que provocam a terminação da síntese da cadeia de DNA) está associado a um marcador fluorescente diferente, apresentando uma cor diferente dependendo do ddNTP que tiver sido incorporado. À medida que as bandas vão passando pelo detetor de fluorescência, este envia a informação a um sistema de imagem que irá processá-la e produzir um gráfico semelhante ao ilustrado em (B), onde cada pico representa a incorporação do ddNTP respetivo em determinada posição.

## 2.4 Gastronomia Molecular como Metodologia para Inovação

O termo “gastronomia molecular” surgiu em 1988 como uma disciplina que criaria a ponte entre as ciências dos alimentos (mais ligada a processos tecnológicos em larga escala) e as cozinhas de pequena escala [82]. Os seus fundadores, Hervé This e Nicholas Kurti, escolheram este nome pois “gastronomia”, segundo Brillat-Savarin, designa todo o conhecimento inteligente relativo a tudo o que sirva de alimento ao Homem. A



gastronomia integra conhecimento na área da história natural, física, química, culinária, negócios e economia política [83]. This e Kurti definiram inicialmente a sua nova disciplina como “Gastronomia Física e Molecular” [82], pois procurava estudar os aspetos físicos e moleculares dos processos culinários e dos alimentos em si, mas mais tarde acabou por ser abreviado para “Gastronomia Molecular”.

As atividades culinárias basearam-se sempre em conhecimento empírico e nunca se procurou compreender os fenómenos por detrás dos processos culinários. Este é um dos objetivos da Gastronomia Molecular, sendo que os outros incluem o melhoramento de receitas já existentes, o desenvolvimento de novas receitas através do conhecimento teórico científico, e a introdução de novas técnicas, instrumentos e ingredientes na cozinha [84], resultando numa ligação entre a Ciência e a Arte, aliando cientistas a cozinheiros.

#### 2.4.1 Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares

A inovação está na base do sucesso e da sobrevivência de qualquer empresa. No domínio dos produtos alimentares, a inovação pode surgir na forma de uma extensão de linha, de um reposicionamento ou reformulação de um produto já existente, numa nova forma ou tamanho de um dado produto, de uma nova embalagem para um produto existente, ou na forma de um produto inovador ou criativo (tabela 2.3) [85].

**Tabela 2.3** Tipos de novos produtos alimentares (adaptada da referência 85).

Tipo de Novo Produto	Exemplos	Características Gerais
<b>Extensão de linha</b>	Um novo sabor numa linha de águas aromatizadas.	Desenvolvimento e investigação requerem pouco tempo.
	Uma nova variedade numa linha de sopas prontas a servir.	Não são necessárias grandes alterações no fornecimento de matérias-primas, processo de produção e armazenagem ou estratégia de marketing.
<b>Reposicionamento de um produto existente</b>	Produtos contendo aveia reposicionados como produtos que reduzem o colesterol.	Desenvolvimento e investigação requerem pouco tempo.
	Produtos contendo soja reposicionados como produtos que combatem o cancro.	Não são necessárias grandes alterações no fornecimento de matérias-primas, processo de produção e armazenagem.  Requer desenvolvimento de novas estratégias de marketing e técnicas de vendas para o posicionar em novos nichos de mercado ou novos mercados.
<b>Nova forma ou tamanho de um produto existente</b>	Fruta já descascada e/ou em gomos.	Impacto variável na investigação e desenvolvimento.

	Chás e cafés instantâneos.	Impacto variável no processo de produção e nas instalações fabris.
		Requer desenvolvimento de novas estratégias de marketing e técnicas de vendas.
<b>Reformulação de um produto existente</b>	Produtos de baixo teor calórico. Produtos lácteos sem lactose.	Investimento em investigação e desenvolvimento moderado, consistente com o objetivo da reformulação.  Pouco impacto nas instalações fabris, processo de produção, estratégia de marketing e vendas, a não ser que a reformulação leve a um reposicionamento do produto.
<b>Nova embalagem para um produto existente</b>	Embalagens individuais de iogurte, leite, etc.  Molhos (ketchup, mostarda) em embalagens de espremer.	A novidade da embalagem determinará o investimento em investigação e desenvolvimento.  Algum impacto na produção. É necessária a aquisição de novo equipamento de embalagem.  Pequeno impacto na estratégia de marketing, vendas e distribuição.
<b>Produto inovador</b>	Kits para refeições.  Refeições congeladas.	Investimento na investigação e desenvolvimento dependente da natureza da inovação.  Impacto muito variável no processo de produção e instalações fabris.  Requer desenvolvimento de novas estratégias de marketing e técnicas de vendas.
<b>Produto criativo</b>	Falso caviar.  Surimi (delícias do mar).	Grande investimento em investigação e desenvolvimento.  Processo de investigação e desenvolvimento longo.  Pode requerer uma nova instalação fabril ou equipamento (inclusivamente desenvolvimento de novo equipamento).  Requer desenvolvimento de novas estratégias de marketing e técnicas de vendas. Pode mesmo requerer a criação de uma nova marca ou empresa.  Alto risco de insucesso.

Os avanços tecnológicos trouxeram novos ingredientes e novos processos que permitiram o desenvolvimento de produtos que anteriormente seriam impossíveis de produzir.

Também trouxeram novos materiais que permitiram uma evolução nos métodos de embalamento e acondicionamento dos produtos alimentares [85].

### 2.4.2 Hidrocolóides

Um hidrocolóide é uma substância com características hidrofílicas, devidas à presença de vários grupos hidroxilo (-OH) que formam ligações com moléculas de água, capazes de formar dispersões coloidais numa fase contínua aquosa [86]. As misturas coloidais caracterizam-se pela dimensão microscópica das partículas na fase dispersa, produzindo sistemas que, a olho nu, aparentam ter apenas uma fase.

Os hidrocolóides são um grupo de polímeros de cadeias longas (polissacáridos ou proteínas) caracterizados pela sua capacidade de formar dispersões viscosas e/ou géis quando misturados em água. Estas propriedades conferem a estes compostos um enorme interesse em aplicações na indústria alimentar, sendo utilizados como espessantes, gelificantes, emulsionantes, estabilizantes e servem ainda para controlar a formação de cristais de gelo ou açúcar nos alimentos [86].

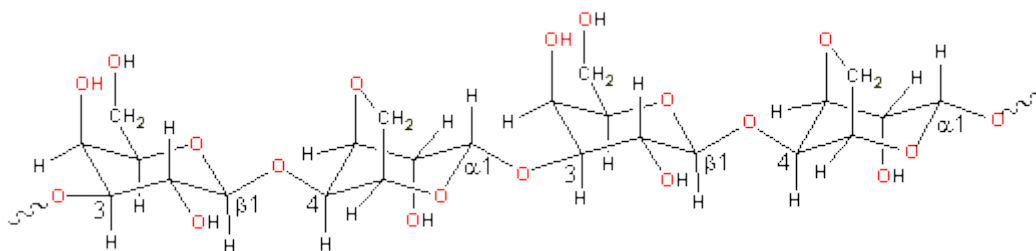
Estes compostos encontram-se classificados como “emulsionantes, estabilizadores, espessantes e gelificantes” na lista de aditivos alimentares aprovados pela União Europeia [87]. Existem várias substâncias hidrocolóides diferentes, mas apenas serão abordadas aquelas que foram utilizadas no presente trabalho: agar, carrageninas e goma de alfarroba.

#### 2.4.2.1 Agar (E406)

O agar (ou agar-agar) é um polissacárido produzido por algumas espécies de algas vermelhas (*Rhodophyceae*) [88, 89]. Constitui as reservas de polissacáridos destas algas, pelo que o seu conteúdo e composição variam de acordo com as condições fisiológicas dos organismos e do meio em que se encontram [90]. As algas produtoras de agar mais utilizadas na indústria são dos géneros *Gelidium* (produzem géis mais fortes) e *Gracilaria* (géis mais fracos) [89].

O agar é uma mistura constituída maioritariamente por agarose e agaropectina em menor proporção [88]. A agarose é um polímero linear composto por unidades de D-galactopirranose ligadas por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  a 3,6-anidro-L-galactopirranose que, por sua vez, se encontra ligada na forma  $\alpha(1\rightarrow3)$  ao próximo resíduo de D-galactopirranose (figura 2.13).





**Figura 2.13** Estrutura da molécula de agarose (imagem retirada da referência 91). O primeiro resíduo representado a contar da esquerda é a D-galactopirranose que se encontra ligada à 3,6-anidro-L-galactopirranose por uma ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ . Esse resíduo, por sua vez, está ligado à D-galactopirranose seguinte por uma ligação  $\alpha(1\rightarrow3)$ .

A estrutura da agaropectina é semelhante à da agarose, mas é bastante heterogênea, apresentando grupos laterais diferentes tais como grupos sulfato, metilo e ácido pirúvico. Os substituintes presentes nesta molécula diferem de acordo com a espécie de alga e com fatores fisiológicos e ecológicos [89].

Em termos do processo de gelificação, é a agarose o componente mais relevante para a formação de um gel de agar [90]. A gelificação do agar é um fenômeno físico resultante da formação de pontes de hidrogénio entre as cadeias lineares, que se associam aleatoriamente em hélices, que depois se vão ligar entre si (novamente por pontes de hidrogénio), formando estruturas mais complexas. Estas hélices são estabilizadas pelas moléculas de água contidas no seu interior. A estrutura tridimensional resultante desta complexa associação de moléculas é o que vai dar origem à matriz do gel [88, 89].

As propriedades e modo de utilização do agar estão listados no **Anexo I, a**. Quanto às suas aplicações, o agar já era utilizado na Ásia há 350 anos em receitas tradicionais, antes de ter sido introduzido no Ocidente e de ter aparecido na cozinha moderna. Atualmente o agar é utilizado na indústria alimentar em sobremesas, gomas, doces, aspics, carnes enlatadas, caviars de imitação, coberturas de bolos, molhos e sopas, tirando partido das suas capacidades enquanto espessante e gelificante [89].

O agar permite a elaboração de gelatinas e sobremesas com frutas como o ananás e kiwi, pois é resistente às proteases que estes frutos possuem (ao contrário da gelatina). Nas carnes enlatadas o agar em pó é adicionado à carne, resultando num produto mais suculento que é mais fácil de cortar [89]. Nas coberturas de bolos, o agar atua como um estabilizante. Este composto permite uma melhor adesão do produto ao bolo e retém a humidade, pelo que evita que a superfície da cobertura seque e quebre [89].

Nos molhos e sopas, o agar atua como espessante, melhorando a textura do produto. Na cozinha moderna, o agar é utilizado para fazer géis quentes, “esparguetes” e esferificações em óleo frio, por exemplo.

### 2.4.2.2 Carrageninas (E407 e E407a)

A carragenina é um polissacárido que ocorre naturalmente em algumas espécies de algas vermelhas da família Rhodophyceae [92]. As espécies principais utilizadas na produção das carrageninas disponíveis comercialmente incluem *Kappaphycus alvarezii* (ou *Eucheuma cottonii*), *Eucheuma denticulatum* (ou *E. spinosum*), *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata* [92, 93].

Existem duas classes de produtos com carrageninas: extrato de carragenina e carragenina semi-refinada (ou algas *Eucheuma* transformadas, AET) [87, 93]. No primeiro caso as carrageninas encontram-se numa forma solúvel, isoladas da matéria algal; enquanto no segundo caso, estes hidrocolóides apresentam-se ainda dentro da matriz celulósica estrutural das algas [93]. Na lista de aditivos alimentares aprovados pela União Europeia, disponível na página da ASAE [87], estes produtos encontram-se classificados como:

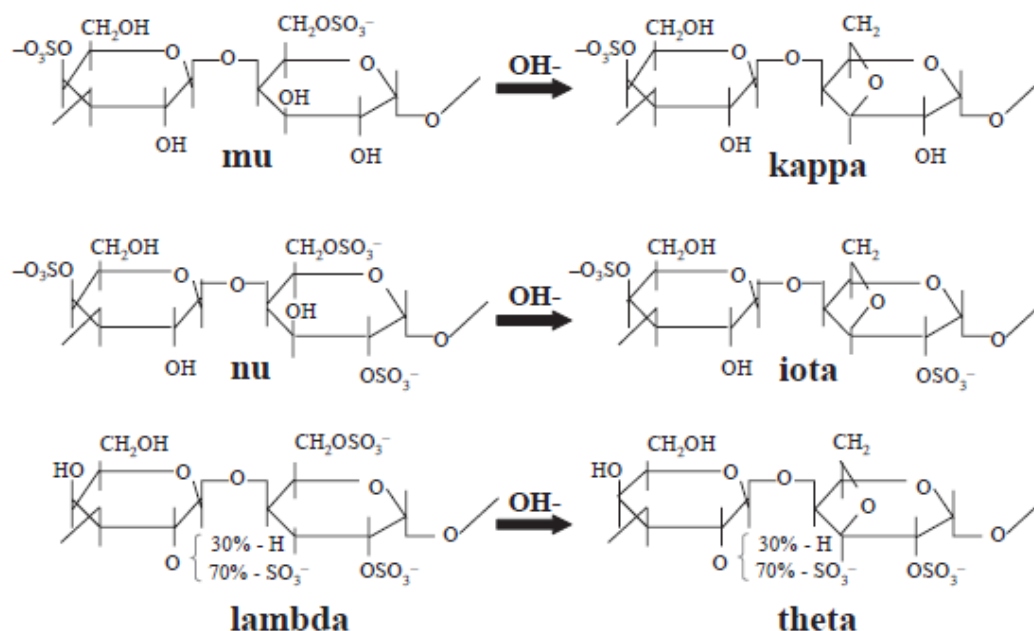
---

**E 407 — Carragenina;** mistura complexa de polissacáridos portadores de grupos sulfato na forma de sais de cálcio e magnésio, produzida por algas vermelhas (p. ex., *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata*), é utilizada como emulsionante, espessante e gelificante.

**E 407a —Algas *Eucheuma* transformadas;** com propriedades hidrocoloidais obtida a partir de algas vermelhas da classe Rhodophyceae, *Eucheuma cottonii* ou *E. spinosum*, que para além de carragenina, pode conter até 15% de celulose insolúvel; usado como espessante, gelificante e emulsionante.

---

A concentração e a composição de carrageninas presentes nas algas varia entre espécies e até mesmo entre as várias partes da própria planta. A estrutura geral das carrageninas consiste numa cadeia linear de moléculas de galactose e 3,6-anidrogactose sulfatadas ou não, associadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,3) e  $\beta$ -(1,4). Os diferentes tipos deste polissacárido diferem na proporção e posição dos grupos éster sulfato e na proporção de 3,6-anidrogactose [93]. Os três tipos utilizados na indústria alimentar são as kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) e lambda ( $\lambda$ ) carrageninas [94] (figura 2.14).



**Figura 2.14 Estruturas das carrageninas principais** (adaptada da referência 93). Mu e nu carrageninas são precursores das kappa e iota, respetivamente, que são convertidas por modificação alcalina. As lambda carrageninas ocorrem naturalmente e, na presença de uma base, são modificadas a theta carrageninas. Estes tipos de carrageninas podem ser preparados na sua forma pura por métodos de extração seletivos a partir de algas específicas.

Quanto mais grupos éster sulfato estiverem presentes, menor será a temperatura de solubilização das carrageninas e mais fracos serão os géis formados, ou não haverá sequer a formação de um gel, como é o caso da λ-carragenina, que é apenas utilizada como espessante [94].

No geral, as carrageninas são utilizadas para espessar, estabilizar e gelificar preparados. Têm a particularidade de interagir com proteínas, sendo muito utilizadas em produtos lácteos. Nestes sistemas, existem micelas de caseína que apresentam concentrações de cargas positivas na sua periferia, isto atrai os grupos sulfato das carrageninas que apresentam carga negativa. Formam-se então complexos entre este hidrocolóide e as proteínas do leite, levando à estabilização, espessamento ou gelificação do produto lácteo, dependendo da concentração de carrageninas utilizada [94].

As κ- e ι-carrageninas gelificam com o abaixamento da temperatura e na presença de cátions apropriados, ocorrendo um alinhamento dos polímeros em hélices que se poderão ligar entre si. As κ-carrageninas reagem com iões de cálcio ou potássio, sendo que no primeiro caso formam géis firmes e quebradiços, contudo na presença de potássio formam-se géis muito firmes mas elásticos. As ι-carrageninas gelificam na presença de cálcio, dando origem a géis fracos [94].

As propriedades e modo de utilização das carrageninas encontram-se apresentados no **Anexo I, b**. As  $\kappa$ -carrageninas são geralmente utilizadas para sobremesas gelificadas (como um substituinte da gelatina) e coberturas de bolos. Poderão ser conjugadas com outros hidrocolóides como iota carrageninas, goma de alfarroba ou konjac, para se obter a textura desejada. Este tipo de carragenina é também utilizado em produtos cárneos enlatados para aumentar a suculência do produto, facilitar o corte e proporcionar um *mouthfeel* agradável [93].

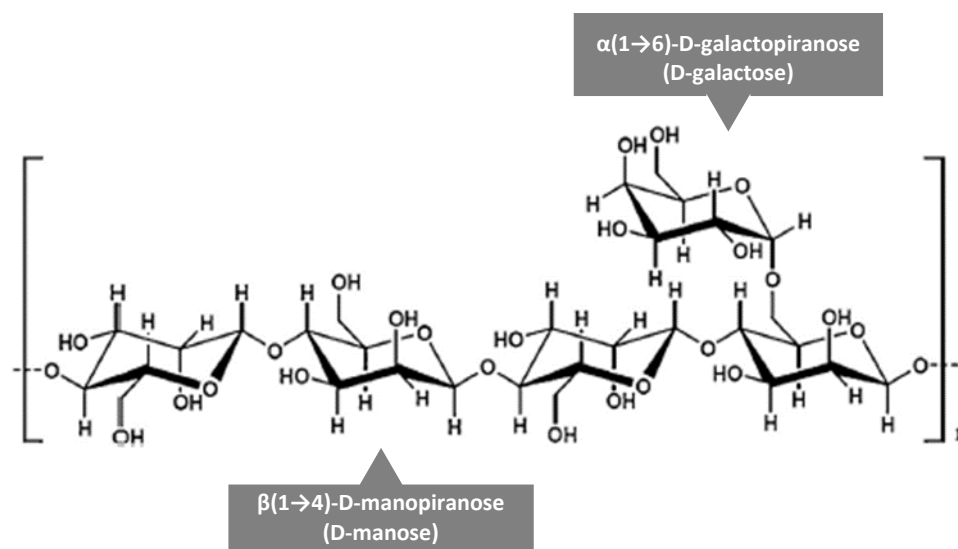
As propriedades reversíveis dos géis de  $\iota$ -carragenina são utilizadas para estabilizar molhos com elementos em suspensão (ervas, por exemplo), bebidas de soja e de leite esterilizado. Concentrações mais elevadas deste hidrocolóide formam géis suaves, adequados para molhos para carnes enlatadas [93].

Concentrações baixas de carragenina são usadas para estabilizar batidos, gelados, leite com chocolate, e cremes pasteurizados e esterilizados, inibindo a separação dos componentes (soro, gordura, chocolate), e controlando a textura e formação de cristais de gelo, no caso dos gelados [92, 93]. As carrageninas são também utilizadas para a produção de queijos processados, um tipo de queijo que apresenta uma boa estrutura, mas que é fácil de cortar e derrete facilmente [93].

As carrageninas do tipo kappa formam sinergia com goma de alfarroba, produzindo géis muito firmes, coesos, extremamente elásticos e com excelente controlo de sinérese [93]. Esta mistura de hidrocolóides foi utilizada neste trabalho sob a forma de um produto denominado “Elastic” da marca Sosa (Espanha).

### 2.4.2.3 Goma de Alfarroba (E410)

A goma de alfarroba consiste essencialmente em galactomananas obtidas do endosperma da semente de alfarroba, o fruto da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*). As galactomananas que compõem a goma de alfarroba são polissacáridos de elevado peso molecular compostos por duas unidades fundamentais: galactose e manose. A cadeia principal é composta por unidades de  $\beta$ -D-manopirranose (manose) associadas por ligações (1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais compostas por resíduos de  $\alpha$ -D-galactopirranose (galactose) com ligações (1 $\rightarrow$ 6) [95] (figura 2.15).



**Figura 2.15** Estrutura geral de um segmento de galactomanana (adaptada da referência 95). A distribuição dos resíduos de D-galactose podem ser aleatórios, em blocos e/ou ordenados.

A estrutura das galactomananas afeta as suas propriedades. Quanto menos resíduos de galactose estiverem presentes na cadeia principal, maior será a sua flexibilidade, mas a distribuição desigual das cadeias laterais vai comprometer a solubilidade, e as misturas resultantes serão menos viscosas e os géis mais fracos [96].

As propriedades e modo de utilização da goma de alfarroba encontram-se apresentados no **Anexo I, c**. A goma de alfarroba é muito utilizada em produtos congelados, como é o caso dos gelados, pela sua capacidade de reduzir o tamanho dos cristais de gelo formados, conferindo uma textura agradável ao produto final. Para além disso, a matriz formada por este hidrocolóide fornece resistência ao descongelamento sem deixar um *mouthfeel* muito viscoso [96].

É também usada como espessante e estabilizante em várias bebidas, devido à sua estabilidade a uma gama alargada de pH. Em produtos de pastelaria melhora a textura final e aumenta a viscosidade da massa, o que ajuda na retenção dos gases em massas fermentadas, levando a um aumento do rendimento do produto. A goma de alfarroba é usada como agente ligante em massas sem glúten, conferindo ao produto final uma estrutura semelhante aos equivalentes com glúten [95].

Em recheios de pastelaria, a presença de goma de alfarroba confere-lhes maior estabilidade e evita que vertam para fora dos produtos durante o cozimento ou que ensopem a massa que os rodeia [96].

## 2.5 Técnicas de Análise Sensorial

A análise sensorial é uma disciplina científica cujo objetivo é a caracterização de um produto através dos sentidos (visão, olfato, gosto, tato, e audição) de acordo com metodologias que a tornem o mais objetiva possível. As provas de análise sensorial têm uma grande importância em estudos de aceitação do consumidor e no controle de qualidade de produtos alimentares, sendo uma ferramenta muito relevante na área da indústria alimentar [97].

As provas são realizadas por painéis de provadores, podendo estes serem treinados ou não, dependendo do objetivo pretendido [97]. Por exemplo, caso se pretenda testar a reação do consumidor perante um dado produto alimentar, a prova será feita com um painel não treinado constituído por potenciais consumidores do produto; por outro lado, numa prova cujo objetivo é o de avaliar e/ou enumerar as características de um dado produto, conta-se com a participação de um painel treinado nesse mesmo produto.

Existem, então, vários tipos de métodos de análise sensorial: afetivos, de diferença ou discriminativos, analíticos ou descritivos, e de sensibilidade [97]. No presente trabalho realizaram-se apenas testes afetivos.

Nas provas afetivas avalia-se a opinião subjetiva dos provadores em relação a um dado produto, e são realizados entre consumidores habituais ou potenciais do produto testado [97]. Dentro deste género de provas, existem vários tipos de testes, os de preferência, em que o indivíduo tem de identificar a sua amostra preferida ou ordená-las por ordem de preferência; os de aceitação por escala hedónica, em que o indivíduo pontua o quão gosta ou não de um dado produto; os de aceitação por escala do ideal (ou intensidade), em que se avalia se o grau de intensidade de um dado atributo é ou não aceitável; e finalmente, os testes de escala de atitude ou de intenção, em que o consumidor expressa a sua vontade em consumir, adquirir ou comprar o produto em estudo [98].

Os restantes métodos de análise sensorial acima enunciados são mais objetivos que os afetivos. Os testes discriminativos avaliam a existência ou não de diferenças entre as amostras analisadas e podem ser aplicados em controlo de qualidade, desenvolvimento de novos produtos, e para testar a precisão e a confiabilidade dos provadores. Por outro lado, os testes descritivos pretendem descrever e quantificar os atributos presentes no produto avaliado; e os testes de sensibilidade servem para treinar um painel de provadores em relação a estímulos olfativos ou gustativos [97].

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1 Obtenção das Culturas de Kombucha

As culturas de kombucha foram fornecidas pelo Laboratório de Bioenergética Microbiana (LBM) do Instituto Superior de Agronomia, da Universidade de Lisboa (ISA-UL), e por uma produtora de kombucha caseira, de Braga. As culturas apresentavam-se na forma de películas frescas imersas em kombucha já fermentada. As mães de kombucha do LBM foram cultivadas em chá preto e encontravam-se armazenadas a 4°C enquanto as de Braga foram cultivadas em chá verde e foram transportadas e armazenadas à temperatura ambiente.

Foi obtido um total de sete conjuntos de culturas do LBM, que foram rotulados como K1, K2, K3, K4, K5, K6 e K[vinagre]. A cultura originária de Braga foi denominada de KB.

### 3.2 Preparação da Base de Chá

A base de chá para a kombucha foi preparada com água da torneira levada à fervura, à qual foram adicionadas 2 saquetas de chá por cada litro de água. O chá foi deixado em infusão durante 10 minutos, tendo-se adicionado depois açúcar branco granulado numa concentração de 10% (p/v), enquanto o chá ainda estava quente. Após a dissolução do açúcar, o chá adoçado foi deixado a arrefecer, tapado, até atingir a temperatura ambiente (entre 20 a 25 °C).

### 3.3 Seleção e Preparação do Inóculo

Preparou-se chá preto (Yellow Label, Lipton®) e chá verde (Dia) segundo o método descrito em 3.2. Dividiu-se em porções de 500 mL em recipientes de vidro estéreis e procedeu-se à inoculação do chá com a respetiva cultura de kombucha e uma porção de kombucha já fermentada (cerca de 15 mL).

Os recipientes foram tapados com gaze segura por elásticos. A fermentação decorreu numa estufa a cerca de 28°C durante 5 dias.

As bebidas resultantes desta fermentação foram selecionadas de acordo com as suas características organoléticas (aroma e sabor), tendo-se escolhido as que apresentavam aroma e sabor mais agradáveis.

### 3.4 Preparação de Kombucha

Prepararam-se chá preto e chá verde, e dividiram-se em vários recipientes de vidro, uns contendo uma única cultura de kombucha e outros contendo uma mistura de duas culturas.

Os chás foram inoculados com uma cultura de kombucha (película), com cerca de 7 cm de diâmetro, e 10% (v/v) de kombucha já fermentada. No caso das misturas, usou-se metade de cada película, triturada, e 5% (v/v) de líquido fermentado de cada kombucha envolvida na mistura.

Os recipientes foram tapados com gaze segura por elásticos. As preparações foram incubadas numa estufa a cerca de 28°C durante 5 a 7 dias.

### 3.5 Meios de Cultura

Os meios de cultura usados no presente trabalho foram: meio de chá, consistindo na base de chá preto (descrita acima) com 2% (p/v) de agar; meio Hestrin-Schramm (HS) contendo 2% (p/v) de glucose, 0.5% (p/v) de peptona, 0.5% (p/v) de extrato de levedura, 0.27% (p/v) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.115% (p/v) de ácido cítrico.H<sub>2</sub>O, a pH 5 [25], e com 1.5% (p/v) de agar; meio GYC contendo 5% (p/v) de glucose, 1% (p/v) de extrato de levedura, 3%



(p/v) de  $\text{CaCO}_3$ , a pH 4.5, e com 2,5% (p/v) agar; meio MEA 2.5% (p/v) com 2% (p/v) de agar; e meio YPD contendo 2% (p/v) de glucose, 2% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedura e 2% (p/v) de agar.

### 3.6 Isolamento de Microrganismos de Kombucha de Chá Preto

Foram retiradas amostras de kombucha e feitas várias diluições, que foram depois plaqueadas (em duplicado) em meio de chá, HS com 0.015% de cicloheximida, GYC, YPD com 0.01% de tetraciclina e MEA. As placas foram incubadas em condições aeróbias, a temperaturas entre 25 a 28 °C até se observar crescimento.

Observaram-se as placas preparadas e realizou-se a descrição macromorfológica das colónias obtidas. Selecionaram-se as colónias macromorfológicamente mais distintas e procedeu-se à sua observação microscópica.

As culturas foram mantidas regularmente em placas com meio YPD ou GYC consoante correspondiam a leveduras ou bactérias, respetivamente.

### 3.7 Produção de Kombucha a partir de Isolados

Os microrganismos selecionados e isolados foram inoculados em 50 mL de meio YPD líquido (glucose 2% [p/v], peptona 2% [p/v], extrato de levedura 1% [p/v]) e incubados numa estufa com agitação (no caso das leveduras) ou sem agitação (no caso das bactérias), a 28°C durante 3 dias.

Após esse tempo, mediu-se a absorvância (ou densidade ótica) das amostras a 600 nm e, a partir desta informação, calculou-se o volume de suspensão a retirar. A quantidade de suspensão microbiana utilizada para a inoculação dos chás foi calculada tendo como base as seguintes razões:

$$DO_{600\text{ nm}} = 1 \Rightarrow 3 \times 10^7 \text{ células/mL (para as leveduras) [99]}$$

$$DO_{600\text{ nm}} = 1 \Rightarrow 1 \times 10^9 \text{ células/mL (para as bactérias) [100]}$$

Pretendeu-se obter uma concentração final de  $1 \times 10^5$  células/mL tanto para as bactérias [41] como para as leveduras [21].

Os respectivos volumes de amostra foram colocados em eppendorfs que foram centrifugados à velocidade máxima (14 000 rpm) durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de água desmineralizada estéril.

Foi preparada uma base de chá preto que foi dividida em recipientes de vidro contendo 200 mL de chá. Cada frasco foi inoculado com um microrganismo diferente ou com uma mistura de microrganismos.

Os chás foram incubados numa estufa a 28°C e foram acompanhados ao longo da sua fermentação, durante 28 dias.

### 3.8 Técnicas Moleculares de Identificação de Microrganismos

#### 3.8.1 Extração de DNA

##### 3.8.1.1 Leveduras

Para a extração de DNA, seguiu-se o método descrito por Akada *et al.*, 2000 [101]. Transferiu-se biomassa das culturas puras cultivadas em YPD, com o auxílio de um palito estéril, para eppendorfs contendo 20 µL de uma solução de SDS a 0.25% (p/v). Agitou-se no vórtex durante 10 segundos, aqueceu-se num banho a 90°C durante 3 minutos, centrifugou-se a 14 800 rpm durante 30 segundos e recolheu-se o sobrenadante.

##### 3.8.1.2 Bactérias Acéticas

Para a extração de DNA seguiu-se o método de “*boiling*” adaptado de Millar *et al.*, 2000 [102]. Transferiu-se biomassa das culturas puras cultivadas em GYC, com o auxílio de um palito estéril, para eppendorfs contendo 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 com 1 mM EDTA). Incubaram-se as amostras num banho a 95°C durante 15 minutos, centrifugaram-se a 13 000 × g durante outros 15 minutos e recolheu-se o sobrenadante.

### 3.8.2 Amplificação de DNA

#### 3.8.2.1 Leveduras

A amplificação do DNA extraído foi realizada por PCR, utilizando os *primers* ITS4 e ITS5 (ambos da STAB VIDA, Portugal) (**tabela 3.1**).

**Tabela 3.1** Sequências dos *primers* ITS4 e ITS5 (informação retirada dos documentos fornecidos pela STAB VIDA, Portugal).

<i>Primer</i>	<i>Sentido</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>
ITS4	<i>Reverse</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	<i>Forward</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

A mistura utilizada para a reação foi a seguinte (**tabela 3.2**):

**Tabela 3.2** Mistura reacional para PCR. 5× Phusion HF Buffer e Phusion DNA Polymerase da Thermo Scientific™ (EUA); dNTPs NZYMix da NZYTech (Portugal).

	<b>Volume (μL)</b>
5× Phusion HF Buffer	10
H <sub>2</sub> O mili-Q estéril	35.8
<i>Primer</i> ITS4 10 μM	1
<i>Primer</i> ITS5 10 μM	1
dNTPs NZYMix 10 mM	1
Phusion DNA Polymerase (2 U/μL)	0.2
DNA	1
<b>Volume total</b>	<b>50</b>

Utilizaram-se soluções do DNA extraído em **3.8.1.1** puro e após diluições de 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup>.

O PCR foi realizado num termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf, Alemanha), segundo o programa abaixo descrito (**tabela 3.3**):

**Tabela 3.3** Programa de PCR utilizado para as leveduras (*primers* ITS4 e ITS5).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	7	1
Desnaturação	95	1	40
<i>Annealing</i>	52	1	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1

### 3.8.2.2 Bactérias Acéticas

O protocolo de amplificação de DNA de bactérias acéticas foi adaptado de Camilo, 2014 [103]. A amplificação do DNA extraído foi realizada com o auxílio de um PCR, utilizando os *primers* Ac1 e Ac3 (ambos da STAB VIDA, Portugal) (**tabela 3.4**).

**Tabela 3.4** Sequências dos *primers* Ac1 e Ac3 (informação retirada dos documentos fornecidos pela STAB VIDA, Portugal).

Primer	Sentido	Sequência (5'-3')
Ac1	<i>Forward</i>	GCTGGCGGCATGCTTAACACAT
Ac3	<i>Reverse</i>	AACCACATGCTCCACCGCTTG

A mistura utilizada para a reação foi a mesma descrita para as leveduras (**tabela 3.2**), mas utilizando os *primers* acima mencionados.

Utilizaram-se soluções do DNA extraído em 3.8.1.2 nas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . Optou-se não utilizar a solução  $10^0$  para prevenir eventual inibição da reação por produtos contaminantes resultantes do protocolo de extração de DNA.

A reação de amplificação PCR foi realizada num termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf, Alemanha), segundo o programa abaixo descrito (**tabela 3.5**):

**Tabela 3.5** Programa de PCR utilizado para as bactérias acéticas (*primers* Ac1 e Ac3).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	7	1
Desnaturação	95	1	40
<i>Annealing</i>	64	2	
Extensão	72	2	
Extensão final	72	10	1

### 3.8.3 Quantificação do Produto de PCR

O DNA amplificado por PCR foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose (2.5% [p/v] em TAE 1×), ao qual foi adicionado 1 µL de GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal) para cada 25 mL de tampão. Prepararam-se amostras com 1 µL de *loading buffer* com RNase para cada 5 µL de produto de PCR. Utilizou-se como marcador de peso molecular o NZYDNA Ladder I (NZYTech, Portugal).

Correu-se o gel a 80 V durante 60 minutos para os ensaios com leveduras, e 45 minutos para os ensaios com bactérias acéticas.

### 3.8.4 Sequenciação de DNA

O DNA amplificado foi sequenciado pela empresa STAB VIDA (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST® (NCBI, EUA) com as definições “*Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)*”.

## 3.9 Análise Sensorial

As provas foram realizadas entre 34 indivíduos escolhidos aleatoriamente, de ambos os sexos (16 homens e 18 mulheres), entre os 18 e 76 anos (a maioria abaixo dos 35 anos), aos quais não foi feito qualquer tipo de treino em relação à avaliação sensorial de kombucha. Foram analisadas duas amostras de kombucha, uma produzida no âmbito deste trabalho a partir da cultura K3, e outra pertencente a uma marca presente no

mercado. As amostras foram servidas em copos de plástico transparentes (30 mL), a uma temperatura de cerca de 6 a 10°C [98], e com um volume de 20 mL.

As provas decorreram em ambientes informais (ex.: salas de aula) onde cada provador foi sentado separadamente dos restantes e foi-lhes distribuída uma ficha de prova e as duas amostras de kombucha codificadas com três algarismos aleatórios (722 para a kombucha produzida no âmbito deste trabalho e 530 para a de compra). Os provadores tinham também disponível um copo com água para limpar o paladar.

A ficha de prova foi composta por duas partes, uma em que foi pedido ao provador para escolher a sua amostra preferida (ver **Anexo II, a**), e outra onde o objetivo foi a avaliação hedónica das características organoléticas, da intensidade de atributos de aroma e sabor, e da intenção de compra de cada uma das amostras (ver **Anexo II, b**).

Os atributos incluídos na ficha relativos ao aroma e ao sabor da kombucha foram escolhidos tendo em conta as observações feitas por provadores experientes que tinham já participado em várias provas informais realizadas ao longo deste trabalho.

### **3.10 Desenvolvimento de Novos Produtos Alimentares à base de Kombucha**

#### **3.10.1 Nata de Kombucha**

A metodologia para a produção da *nata* de kombucha baseou-se em duas receitas, uma para *nata de coco* [104] e outra para *nata* de kombucha [105]. Partiu-se de uma película de kombucha com cerca de 1 cm de grossura, cortou-se aos cubos de dimensões de cerca de 1 cm, passou-se por água fria para retirar o excesso de acidez, adicionou-se açúcar branco granulado (em proporções de  $\frac{3}{4}$  do peso dos cubos, ou igual peso) e cozinhou-se numa panela em lume brando durante cerca de 15 minutos. Os cubos (a *nata* de kombucha) foram depois guardados em recipientes fechados, juntamente com a calda de açúcar formada.

#### **3.10.2 Filtração de Kombucha**

A kombucha utilizada nas preparações seguintes foi filtrada a vácuo de modo a remover todos os componentes em suspensão. Foram realizadas duas filtrações sucessivas, em que

na primeira recorreu-se a papel de filtro qualitativo, da marca Whatman® (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) de grau 1 (poros de 11  $\mu\text{m}$ ); e na segunda foram utilizadas membranas de nitrocelulose da Micron-Sep (GVS Life Sciences, EUA) com poros de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### 3.10.3 Géis de Kombucha

Os géis de kombucha foram preparados com agar (*Agar-Agar*, Sosa, Espanha) e com uma mistura de goma de alfarroba e carragenina (*Elastic*, Sosa, Espanha). Foram produzidos géis com 50 mL de volume, com 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1%, 1.5%, 2% e 3% de agar, e com 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5% de Elastic (concentrações em % $[\text{p/v}]$ ). No caso dos géis de agar, o pó foi hidratado e aquecido até dissolver completamente numa porção de água (ver tabela 3.6), e depois perfez-se o volume de 50 mL com kombucha ligeiramente aquecida. Para a preparação dos géis de Elastic, o pó foi hidratado no volume total de kombucha e aquecido até dissolver. Os géis foram colocados em placas de Petri e deixados arrefecer à temperatura ambiente até solidificarem.

**Tabela 3.6** Composição dos géis de agar preparados.

% (p/v) de agar	% (v/v) de água adicionada
0.25	20
0.50	20
0.75	40
1	40
1.5	40
2	50
3	60





## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Kombucha

#### 4.1.1 Seleção e Misturas de Kombucha

As kombuchas que apresentaram aroma e sabor mais agradáveis em chá verde (v) foram as K2 e KB, e em chá preto (p) as K3 e KB. As bebidas foram avaliadas por um conjunto de provadores treinados, sendo que as observações gerais feitas em relação a cada kombucha se encontram resumidas na seguinte tabela (**tabela 4.1**):

**Tabela 4.1** Observações relativas às kombuchas selecionadas.

Base de chá	Cultura	Observações
Chá verde	K2	Aroma a mel; bom equilíbrio ácido/doce.
	KB	Aroma a maçã; intensidade de aroma menor que K2.
Chá preto	K3	Aroma a mel e flores; nível de acidez agradável.
	KB	Nível de acidez agradável, mas o sabor é muito doce.

K2(v) e K3(p) foram consideradas as melhores kombuchas, pelo que foram levadas para a Noite Europeia dos Investigadores 2014 para o painel “Diversidade na vinha, no vinho, e nos micróbios dos nossos petiscos”, desenvolvido pelo CBAA do ISA. No geral, a aceitação do público foi muito positiva em relação a ambas as bebidas.

As kombuchas selecionadas (K2v, K3p, KBp e KBv) apresentaram um perfil de *flavour* bastante distinto e, em vez de se proceder à mistura dos líquidos para produzir uma bebida com sabor e aroma mais complexos, decidiu-se misturar as culturas. Ambas as

películas de kombucha de chá preto foram misturadas e inoculadas em chá preto e o mesmo se procedeu com as películas de chá verde que foram inoculadas no chá equivalente.

Esperava-se obter uma bebida com a soma das características de cada kombucha original, contudo não foi o que se observou. A mistura em chá verde ficou menos agradável em termos de aroma e sabor, relativamente às kombuchas originais. Quanto à mistura em chá preto, apesar de não ter ficado como se esperava, apresentou sabor e aroma agradáveis.

### **4.1.2 Isolamento de Microrganismos de Kombucha de Chá Preto**

Foram retiradas amostras da kombucha de chá preto produzida a partir da mistura das culturas K3p e KBp, que foram inoculadas nos vários meios descritos em 3.5. HS e GYC são utilizados para cultivar bactérias acéticas [25, 106], enquanto YPD e MEA são utilizados para leveduras, daí ter-se optado por estes meios. De modo a inibir o crescimento dos tipos de microrganismos não desejados e favorecer os microrganismos pretendidos, em particular os de crescimento mais lento, ao meio HS foi ainda adicionado um antifúngico (cicloheximida) [107, 108] e ao meio YPD um antibacteriano (tetraciclina) [31].

Foram conseguidos um total de 44 isolados, dos quais foram selecionados 6 (4 leveduras e 2 bactérias) que aparentaram ser mais distintos macro e micromorfológicamente entre si (ver **Anexo III**).

### **4.1.3 Kombucha Produzida a partir de Isolados**

Após o isolamento das leveduras e bactéria acética nos meios seletivos, procedeu-se à inoculação das estirpes isoladas com vista a verificar se estas eram capazes de fermentar chá, quer em associação quer isoladamente, produzindo uma bebida final similar à kombucha de onde tinham sido isoladas.

O primeiro ensaio realizado teve como objetivo principal verificar se a bactéria acética isolada formava película celulósica no chá. Para tal inoculou-se um frasco de chá com os quatro isolados de levedura e a bactéria 1, e incubou-se nas mesmas condições usadas na produção de kombucha. Como controlo, de forma a garantir que todos os isolados apresentavam capacidade de se multiplicar no chá e verificar se a bactéria 1 conseguia produzir película isoladamente, foram inoculados 5 frascos com cada isolado individualmente e incubados nas mesmas condições.

Todos os microrganismos apresentaram crescimento nos respectivos chás, evidenciado pelo depósito formado no fundo dos recipientes. Ao fim de 7 dias já era possível verificar uma alteração no aroma do chá. Ao fim de 28 dias, a bactéria 1 não formou película nem no meio YPD líquido, nem em nenhum dos chás em que estava presente. Conclui-se que esta bactéria não forma película celulósica, pelo menos nestas condições.

Como a principal característica das culturas de kombucha é a película de celulose bacteriana, foi realizado um segundo ensaio desta vez com bactérias acéticas encomendadas da Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia (CBISA). Estas vieram cultivadas em meio GYC e foram as seguintes: *Gluconobacter oxydans* (CBISA 4270), *Gluconacetobacter hansenii* (CBISA 4276 e CBISA 4277) e *Acetobacter aceti* (CBISA 4417).

De acordo com estudos já realizados, algumas estirpes destas espécies de bactérias produzem celulose [109, 110, 111]. Das estirpes encomendadas, apenas CBISA 4277 formou uma película celulósica à superfície do meio YPD líquido.

No segundo ensaio, foi preparado um frasco de chá para cada microrganismo, outro com todas as leveduras e CBISA 4277 inoculados em simultâneo, e um último frasco com todos os microrganismos (também inoculados em simultâneo). Todos os frascos apresentaram crescimento, evidenciado pelo depósito formado no fundo dos recipientes. Ao fim de 5 dias já era possível verificar uma alteração no aroma do chá, mas ao fim de 28 dias nenhum dos frascos contendo CBISA 4277 apresentava formação de película celulósica à superfície. É possível que esta estirpe não forme película nestas condições. Desconhece-se a origem da bactéria, mas é provável que não esteja adaptada a este tipo de meio.

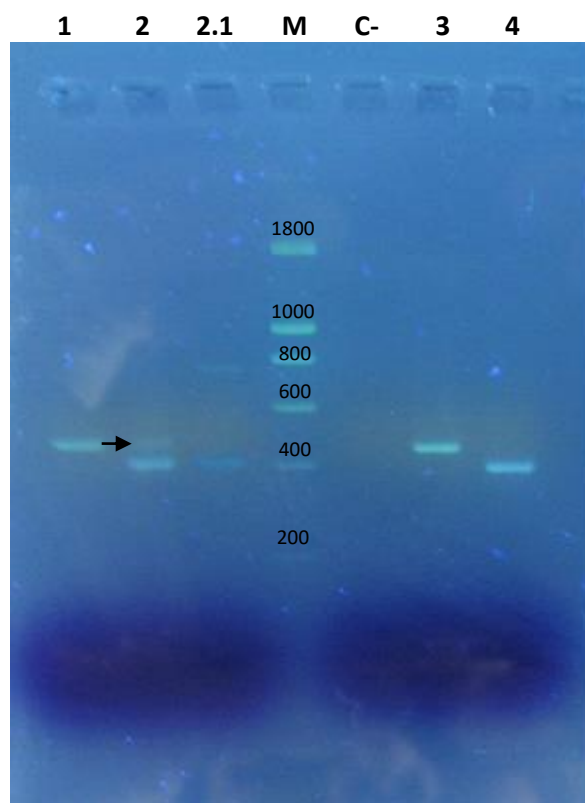
Sugere-se, num futuro ensaio, a inoculação do chá com a película formada em YPD por CBISA 4277, em adição à suspensão celular; ou a utilização de outras bactérias acéticas produtoras de celulose.

#### **4.1.4 Identificação dos Microrganismos**

##### **4.1.4.1 Leveduras**

A amplificação do DNA extraído das quatro leveduras isoladas produziu bandas no gel de eletroforese com vários tamanhos diferentes. O primeiro gel preparado apresentava bandas muito ténues (fotografia não apresentada), portanto o produto de PCR das amostras que produziram bandas (levedura 1 [ $10^{-1}$ ]; levedura 2 [ $10^0$  e  $10^{-1}$ ]; levedura 3

[ $10^{-1}$ ]; e levedura 4 [ $10^0$ ]) foi novamente amplificado e preparou-se um novo gel de eletroforese (**figura 4.1**).



**Figura 4.1** Perfil eletroforético da amplificação de DNA das leveduras isoladas.

**M** – NZYDNA Ladder I, com os respetivos tamanhos assinalados (em pb);

**C-** – Controlo negativo;

**1** – Levedura 1 ( $10^{-1}$ );

**2** – Levedura 2 ( $10^0$ );

**2.1** – Levedura 2 ( $10^{-1}$ );

**3** – Levedura 3 ( $10^{-1}$ );

**4** – Levedura 4 ( $10^0$ ).

A amplificação obtida a partir de DNA genómico da levedura 2 apresentou um total de quatro bandas de tamanhos diferentes nas duas diluições: duas bandas na diluição  $10^0$  (uma entre 400 e 600 pb, assinalada com a seta preta, e outra com cerca de 400 pb) e outras duas na diluição  $10^{-1}$  (uma banda com aproximadamente 800 pb e outra com cerca de 400 pb), o que não era esperado. Procedeu-se à separação das bandas destas amostras através do seu corte do gel de eletroforese e o DNA nelas contido foi purificado através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA). As quatro amostras resultantes, juntamente com as das restantes leveduras foram sequenciadas (STAB Vida, Portugal) e os resultados possíveis da identificação de cada uma encontram-se apresentados na **tabela 4.2**. As sequências resultantes encontram-se apresentadas em anexo (**Anexo IV, a, b, c, d**).

**Tabela 4.2 Resultados possíveis da identificação das leveduras isoladas.** Na linha correspondente à levedura 2, o primeiro conjunto de espécies corresponde à diluição  $10^0$  e o segundo à  $10^{-1}$ . Foram selecionados os resultados com menor valor esperado (*E value*) – valores não apresentados – e com maior percentagem de identidade.

Levedura	Espécie	Identidade (%)
1	<i>Candida californica</i>	100
2	<i>Candida californica</i> (400-600 pb)	99
	<i>Metschnikowia sp.</i> (400 pb)	98
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (800 pb)	83
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (400 pb)	99
3	<i>Candida californica</i>	99
4	<i>Metschnikowia bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i>	98

Três conjuntos de sequências foram identificadas como *Candida californica*: as da levedura 1 e 3, e as da banda de maiores dimensões da diluição  $10^0$  da levedura 2. Como o poço no gel de eletroforese desta amostra era adjacente ao da levedura 1, esta banda pode ter surgido por passagem accidental de parte da amostra da levedura 1 para o poço contíguo.

As sequências correspondentes às bandas de 400 pb da amostra de levedura 2 foram alinhadas (com o auxílio da ferramenta BLAST) e apresentaram uma identidade de 97% (figura 4.2). Apesar de não ser possível distinguir dois tipos de colónias diferentes, macroscopicamente (ver Anexo III, b), a nível microscópico é possível observar células com diferentes morfologias, o que inicialmente se julgou dever a diferentes estádios de desenvolvimento da levedura. Portanto é possível que na amostra da levedura 2 estivessem presentes duas leveduras diferentes: *Zygosaccharomyces rouxii* e *Metschnikowia pulcherrima*.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
590 bits(654)	2e-173	343/352(97%)	1/352(0%)	Plus/Plus
10 <sup>^0</sup>	23	ATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAAACTCTAAATCTTAACCGTCAATAACAC		82
10 <sup>^-1</sup>	23	ATTAATATTGAA-TTACACCCTTTTAGGCACAAACTCTAAATCTTAACCGTCAATAACTT		81
10 <sup>^0</sup>	83	AATTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA		142
10 <sup>^-1</sup>	82	TATCAAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA		141
10 <sup>^0</sup>	143	TTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGC		202
10 <sup>^-1</sup>	142	TTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGC		201
10 <sup>^0</sup>	203	CCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTT		262
10 <sup>^-1</sup>	202	CCCGGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTT		261
10 <sup>^0</sup>	263	GGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCAGCCTTTTTTCC		322
10 <sup>^-1</sup>	262	GGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCC		321
10 <sup>^0</sup>	323	TCACCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGCGGAGGAA		374
10 <sup>^-1</sup>	322	TCACCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA		373

**Figura 4.2 Alinhamento entre as duas sequências das bandas de 400 pb da amostra da levedura 2.** Foram alinhadas as sequências produzidas a partir do *primer* ITS5 pois apresentavam menor número de nucleótidos não identificados (N). “10<sup>^0</sup>” e “10<sup>^-1</sup>” correspondem às respectivas diluições da amostra.

Quanto ao resultado da identificação da levedura 4, *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* é um parasita de artêmias (*Artemia salina*) e encontra-se geralmente em ambientes aquáticos hipersalinos [112]. Como estas condições não se encontram em kombucha, a sequência correspondente ao gene de 18S rDNA desta levedura foi alinhada com a sequência desse mesmo gene de *M. pulcherrima* (mais plausível de ocorrer em kombucha) e obteve-se um resultado de 99% de identidade (figura 4.3), pelo que é muito provável que a levedura 4 corresponda na realidade a esta última levedura.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
666 bits(738)	0.0	374/377(99%)	0/377(0%)	Plus/Plus
Mpulg	1	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAAA		60
Mbicp	152			
Mbicp	152	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATATTGAAATTACACACTTTTAGGCACAAA		211
Mpulg	61	CTCTAAATCTTAACCGTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT		120
Mbicp	212			
Mbicp	212	CTCTAAATCTTAACCTCAATAACTTTATCAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT		271
Mpulg	121	CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATC		180
Mbicp	272			
Mbicp	272	CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATC		331
Mpulg	181	ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGC		240
Mbicp	332			
Mbicp	332	ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGC		391
Mpulg	241	GATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGA		300
Mbicp	392			
Mbicp	392	GATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGA		451
Mpulg	301	ATAAGTTTTAGCCCCATTCTTCTTCTCACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCA		360
Mbicp	452			
Mbicp	452	ATAAGTTTTAGCCCCATTCTTTTCTCTCACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCA		511
Mpulg	361	TATCAATAAGCGGAGGA	377	
Mbicp	512		528	
Mbicp	512	TATCAATAAGCGGAGGA		

**Figura 4.3** Alinhamento entre seqüências dos genes de 18S rDNA de *M. pulcherrima* (Mpulg) e *M. bicuspidata* var. *bicuspidata* (Mbicp). Foram utilizados os seguintes números de acesso do GenBank®: EU137672.1 e KP132407.1, respectivamente.

Das espécies isoladas, apenas *Z. rouxii* foi já descrita como presente em kombucha [15]. Apesar de a presença de *C. californica* e *M. pulcherrima* (forma anamórfica: *Candida pulcherrima*) [113] ainda não ter sido reportada nesta bebida fermentada, estas leveduras foram isoladas em vinhas [114], sendo que *M. pulcherrima* (presente também noutros tipos de frutos) é um agente de controle biológico natural, atuando contra alguns microrganismos patogênicos ou indesejáveis, tais como *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Trichosporon mucoides*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp, *Bipolaris* spp. [115], e leveduras pertencentes aos gêneros *Brettanomyces*/*Dekkera*, *Hanseniaspora* e *Pichia*, sendo que não tem efeito no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* [116].

Jolly e colaboradores (2003a) produziram vinhos a partir de uvas Chenin blanc com uma estirpe de *S. cerevisiae* industrial e combinações desta levedura com duas estirpes diferentes de *C. pulcherrima*. Os autores verificaram que estas estirpes tiveram uma

influência positiva na qualidade dos vinhos resultantes (em relação ao controlo), tendo também recebido uma pontuação mais alta para o atributo “goiaba” na avaliação sensorial do aroma dos vinhos e, em alguns dos casos, para o atributo “frutado” [117]. O papel das leveduras não-*Saccharomyces* na produção de vinho tem sido estudado, de modo a avaliar a sua influência na evolução da fermentação e no perfil do vinho resultante [118, 119].

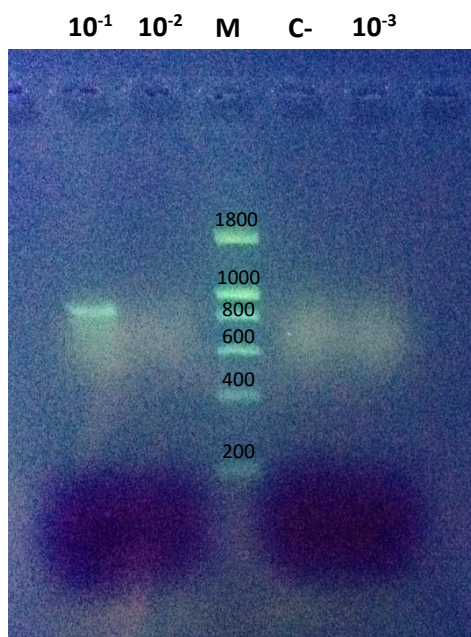
Por outro lado, na produção de vinho de cereja, Sun e colaboradores (2014), verificaram que a utilização de *S. cerevisiae* em combinação com *M. pulcherrima* produzia uma bebida com notas mais acentuadas de “doce”, “verde” e “gorduroso”, contribuindo positivamente para a intensidade e complexidade do perfil aromático do produto final [120]. Na produção de vinho de manga, Sadineni *et al.* (2012), verificaram também que a utilização destas duas leveduras dava origem a uma bebida organolepticamente mais agradável do que aquela produzida apenas por *S. cerevisiae*, de acordo com a prova de análise sensorial realizada [121].

Estes estudos indicam que *M. pulcherrima*/*C. pulcherrima*, conjuntamente com *S. cerevisiae*, produzem um conjunto de compostos aromáticos que favorecem o *flavour* das bebidas fermentadas em que estão presentes. Apesar de, neste trabalho, não ter sido isolada *S. cerevisiae*, esta espécie é descrita como presente na kombucha, portanto é provável que estas duas leveduras sejam responsáveis pela produção de alguns dos compostos aromáticos presentes nesta bebida.

#### 4.1.4.2 Bactérias Acéticas

Das duas bactérias isoladas, só se conseguiu extrair DNA da bactéria 1, dado que a bactéria 2 deixou de apresentar crescimento. A amplificação do DNA desta bactéria produziu uma banda com tamanho entre 800 e 1000 pb, no gel de eletroforese, tal como era esperado [78] (figura 4.4):





**Figura 4.4** Perfil eletroforético da amplificação de DNA da bactéria 1.

**M** – NZYDNA Ladder I, com os respectivos tamanhos assinalados (em pb);

**C-** – Controlo negativo;

**10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>** – amostras nas respetivas diluições.

Os resultados da sequenciação do DNA da bactéria 1 (**Anexo IV, e**) apontam para a possibilidade de esta pertencer a uma das seguintes espécies com igual percentagem de identidade (95%): *Acetobacter papayae*, *A. peroxidans* ou *A. pasteurianus*. Seria necessária a realização de mais ensaios de modo a confirmar a identidade desta bactéria. Apesar de o gene de 16S rDNA ser o mais utilizado para identificar bactérias, este não permite uma distinção precisa entre espécies de bactérias acéticas, pelo que se sugere a amplificação e sequenciação do gene da subunidade B da DNA girase (*gyrB*) com os *primers* descritos por Huang e colaboradores (2014), pois este gene permite diferenciar estas três espécies referidas com maior resolução [122].

Estas espécies de bactérias são muito próximas, sendo normalmente categorizadas no grupo de *Acetobacter pasteurianus*, quando não é possível uma identificação mais precisa [122, 123]. Bactérias deste grupo foram já isoladas de vinagres [123, 124], kombucha [125] e frutos [126, 127].

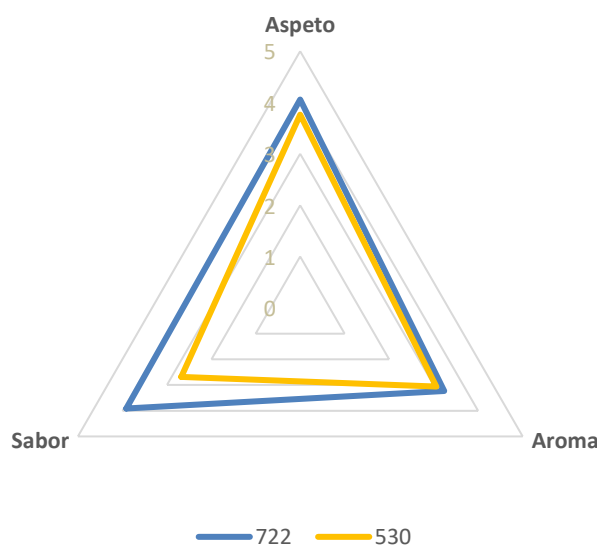
#### 4.1.5 Análise Sensorial

Como a prova foi realizada entre um número reduzido de pessoas (o ideal seria entre 50 a 100 provadores [98]), só foram analisadas tendências. As respostas obtidas estão apresentadas no **Anexo V**.

Foi pedido aos provadores para realizarem uma avaliação hedónica do aspeto, aroma e sabor das kombuchas apresentadas. Para a análise dos resultados obtidos, atribuiu-se uma

pontuação a cada nível da escala utilizada (1 – Muito desagradável; 2 – Desagradável; 3 – Indiferente; 4 – Agradável; 5 – Muito agradável), em que o número de respostas de cada nível foi multiplicado pelo respetivo valor e foi feita a média de pontuação para cada atributo. Os resultados encontram-se representados graficamente na **figura 4.5**.

Apesar de a literatura [98] referir que as escalas mais utilizadas para uma avaliação hedónica são as de 7 ou 9 termos, foram apenas utilizados 5 para tornar a prova mais simples e a resposta mais rápida.



**Figura 4.5** Avaliação hedónica das características organoléticas das kombuchas.

A partir da análise do gráfico, percebe-se que a kombucha 722 foi considerada mais agradável em relação aos atributos avaliados, comparativamente com a 530, que obteve uma pontuação intermédia. Contudo, esta pontuação não se deve a um maior número de respostas do nível 3 (“Indiferente”), mas sim de um grande número de respostas nos níveis 2 e 4 (“Desagradável” e “Agradável”, respetivamente), indiciando a separação do painel de provadores em dois grupos.

Estes resultados estão de acordo com as respostas recolhidas em relação à apreciação global das bebidas. A kombucha 722 foi considerada “Agradável” por 56% dos provadores, enquanto a amostra 530 teve igual quantidade de respostas (35%) tanto no nível “Desagradável” como no “Agradável”.

A kombucha 722 teve uma pontuação mais baixa no aroma, em comparação com os restantes atributos. Alguns provadores comentaram que o aroma desta bebida era

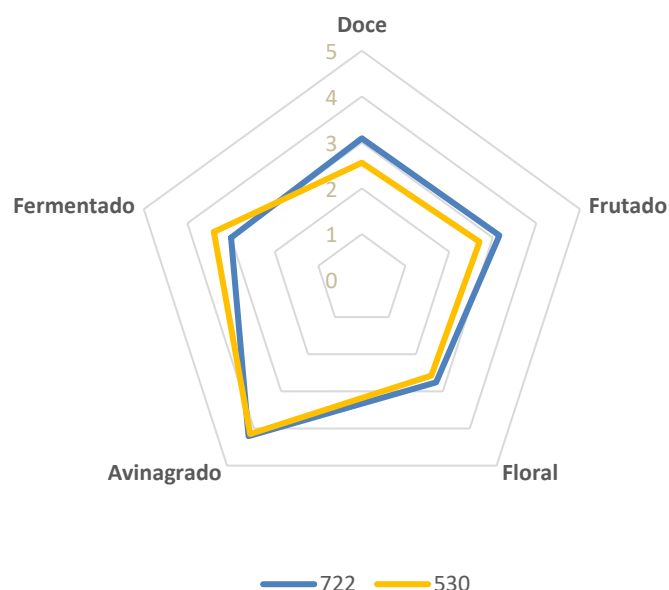
desinteressante ou até desagradável comparativamente ao da 530, que foi considerada mais aromática.

Na ficha de prova era também pedido aos provadores para avaliarem o aroma e o sabor de ambas as kombuchas, tendo em conta a intensidade dos seguintes atributos:

- Doce, frutado, floral, avinagrado e fermentado (para o aroma);
- Doce, ácido e presença de gás (para o sabor).

Para a análise dos resultados obtidos, atribuiu-se uma pontuação a cada nível da escala utilizada (1 - Não perceptível; 2 - Muito pouco [intenso]; 3 - Pouco; 4 - Suficiente; 5 - Muito; 6 - Demasiado) e os dados foram tratados da mesma forma que os anteriores. Os resultados encontram-se representados graficamente nas **figuras 4.6 e 4.7**.

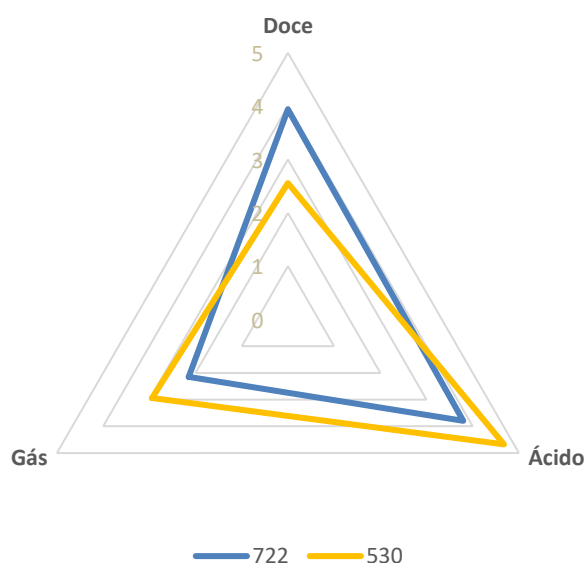
Escolheu-se acrescentar o nível “Não perceptível” a esta escala de 5 pontos, pois havia a possibilidade de um dos atributos não estar presente ou de os provadores não terem capacidade para o detetar.



**Figura 4.6** Intensidades dos diferentes atributos referentes ao aroma. Nota: a linha de grelha referente ao nível 6 (“Demasiado”) não se encontra representada pois os valores médios de cada atributo não chegaram a atingir esse nível.

No geral, o aroma de ambas as amostras foi considerado pouco intenso, com a exceção do atributo “Avinagrado” que foi considerado equilibrado, apesar de ter sido recolhido igual número de respostas para os níveis “Suficiente” e “Muito [intenso]”. Os atributos “Doce”, “Frutado” e “Floral” foram considerados menos intensos em 530 relativamente a 722, apesar de esta primeira amostra ter sido apreciada como mais aromática por alguns

provadores (em observações escritas). O atributo “Fermentado” foi considerado mais intenso em 530 comparativamente a 722, o que era expectável, dado que a primeira bebida sofreu uma fermentação mais prolongada e, ao contrário da 722, não foi clarificada por centrifugação, pelo que provavelmente conteria maior número de microrganismos em suspensão, que continuaram a fermentar a bebida mesmo depois de engarrafada. É importante referir que houve um número significativo (2ª resposta mais pontuada) de provadores que consideraram este atributo como “não perceptível” o que se pensa dever a uma incompreensão do termo relativamente a esta prova, ou a uma incapacidade de avaliar este atributo.



**Figura 4.7** Intensidades dos diferentes atributos referentes ao sabor.

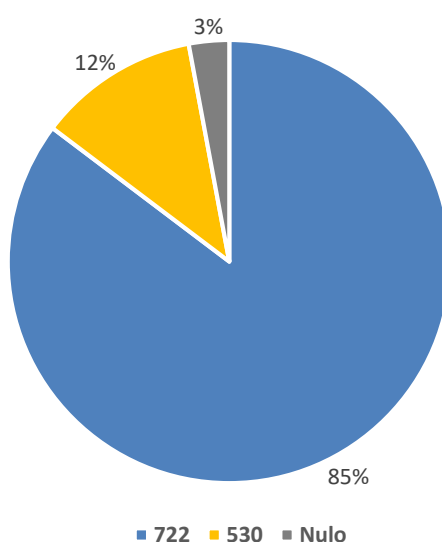
Relativamente ao sabor, a kombucha 722 foi considerada equilibrada em termos de doçura (com 68% de respostas do nível 4 – “Suficiente”), sendo que houve um número igual de pessoas (15%) que acharam a amostra “Muito” e “Pouco” doce. A kombucha 530 foi considerada pouco doce pela maioria, apesar de 21% dos provadores achar a doçura desta amostra suficiente. Esta kombucha foi considerada mais ácida e com mais gás que a 722, o que era esperado, devido às diferenças anteriormente referidas relativas não só ao tempo de fermentação, como ao processo que sofreram (centrifugação) que poderá levar à perda de gás.

Como a kombucha 722 não sofreu nenhuma fermentação depois de engarrafada e dado que o gás é perdido facilmente durante a preparação das amostras servidas, este era praticamente inexistente nesta kombucha, ao contrário da 530 que apresentava algum gás. Ainda assim 24% dos provadores consideraram o gás nesta última amostra como “não

perceptível”, o que pode ser explicado pelas diferenças no tempo de realização da prova por parte de alguns provadores que, em alguns casos, foi muito longo o que pode ter levado à perda parcial do gás ou, como no caso anterior, é possível que algum gás se tenha perdido durante a preparação das amostras para a realização da prova.

A kombucha 722 foi avaliada como equilibrada tanto em acidez como doçura, o que explica a aceitabilidade desta amostra na avaliação hedónica. Por outro lado, a kombucha 530 foi considerada pouco doce e muito ácida o que, de acordo com os resultados anteriores, demonstra que dentro dos provadores escolhidos existem pessoas que apreciam bebidas com este perfil e outras que não.

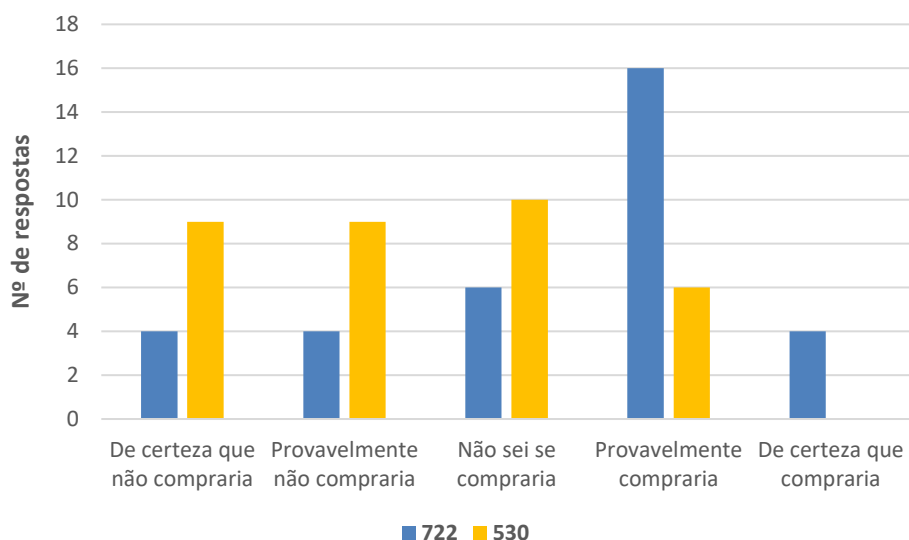
Na prova pareada de preferência, a amostra 722 foi a preferida pela maioria dos provadores (85%), enquanto a 530 obteve 12% dos votos. A restante percentagem corresponde a uma ficha que não foi devidamente preenchida (**figura 4.8**).



**Figura 4.8** Resultado da prova pareada de preferência.

A preferência da 722 contra a 530 está de acordo com os resultados apresentados anteriormente. Alguns provadores comentaram que preferiram a primeira amostra por ser mais doce que a restante, tendo havido algumas observações a referir a kombucha 530 como sendo muito avinagrada. Comparando os resultados com o perfil dos provadores, verificou-se que estes foram independentes da idade ou do sexo dos indivíduos.

De acordo com o que foi até aqui apresentado, era esperada uma maior intenção de compra da kombucha 722 do que da 530, o que foi efetivamente verificado (**figura 4.9**).



**Figura 4.9** Intenção de compra das kombuchas apresentadas.

De acordo com as respostas recolhidas, a kombucha produzida no âmbito deste trabalho seria preferencialmente escolhida face à kombucha existente no mercado apresentada durante a prova, desde que os consumidores já tivessem tido uma experiência prévia de ambos os produtos. Alguns provadores comentaram que gostariam de consumir a kombucha 722 com gelo, o que é uma boa sugestão de apresentação do produto.

Caso a kombucha 722 venha a ser comercializada, sugeria-se a sua colocação na zona dos frios dos supermercados, não só para reduzir a fermentação dentro do recipiente, como também para dispor aos consumidores uma bebida mais agradável sensorialmente. Esta é de facto a zona onde se encontrava exposta a kombucha adquirida no mercado. Uma outra alternativa que permitiria evitar os custos acrescidos que implica a colocação num expositor refrigerado, seria a pasteurização em garrafa (para evitar perdas de gás) e a colocação da sugestão “Deve consumir-se preferencialmente frio” no rótulo da garrafa.

## 4.2 Novos Produtos Alimentares Obtidos a partir de Kombucha

### 4.2.1 Nata de Kombucha

A película de kombucha foi conseguida a partir da cultura K1, que se desenvolveu em chá preto açucarado até atingir a grossura pretendida. Depois de ter sido cortada em cubos (**figura 4.10**), foi provada e entendeu-se que apresentava um sabor muito ácido, pelo que foi lavada até esse sabor se tornar menos intenso. A quantidade de açúcar adicionada também foi ajustada até se considerar o produto final satisfatório. Foi primeiro testada



**Figura 4.10** Película de kombucha cortada aos cubos.

uma proporção de açúcar equivalente ao peso dos cubos e achou-se o resultado final demasiado doce, pelo que na segunda tentativa se utilizou  $\frac{3}{4}$  do peso dos cubos, o que resultou num produto mais aceitável. A *nata* produzida apresentava uma cor acastanhada clara (dado que foi produzida em chá preto), um sabor agridoce forte, mas agradável, e uma textura muito firme e gelatinosa (característica de um gel de celulose).

A *nata de kombucha* foi apresentada no Pavilhão do Conhecimento no âmbito das apresentações finais da disciplina de Seminários do Mestrado de Ciências Gastronómicas, em Junho de 2015 (poster no **Anexo VI**). Foi servida juntamente com a kombucha (bebida) e, no geral, teve uma boa aceitação pela parte do público presente, apesar de apresentar uma textura que geralmente não é muito apreciada pelos ocidentais.

Pretendeu-se criar este produto como um paralelo à “*nata de coco*” ou “*nata de piña*” dos Filipinos, sendo as suas aplicações semelhantes a estes produtos (**figura 4.11**). Poderá ser utilizada em bebidas e sobremesas, podendo aparecer em cadeias de gelados (ou outro tipo de sobremesas) e/ou bebidas como um dos *toppings* possíveis.

Esta é também uma boa solução (especialmente para produtores caseiros) para aproveitar películas de kombucha excedentes que não seriam de outra forma utilizadas.



**Figura 4.11** Alguns exemplos de aplicações de *nata de coco*. (À esquerda) *Milk tea* com *nata de coco* da Saint's Alp Teahouse, em Nova Iorque (imagem retirada da referência 128). (À direita) Gelado de leite condensado com *nata de coco* do Spot Dessert Bar, em Nova Iorque (imagem retirada da referência 129).

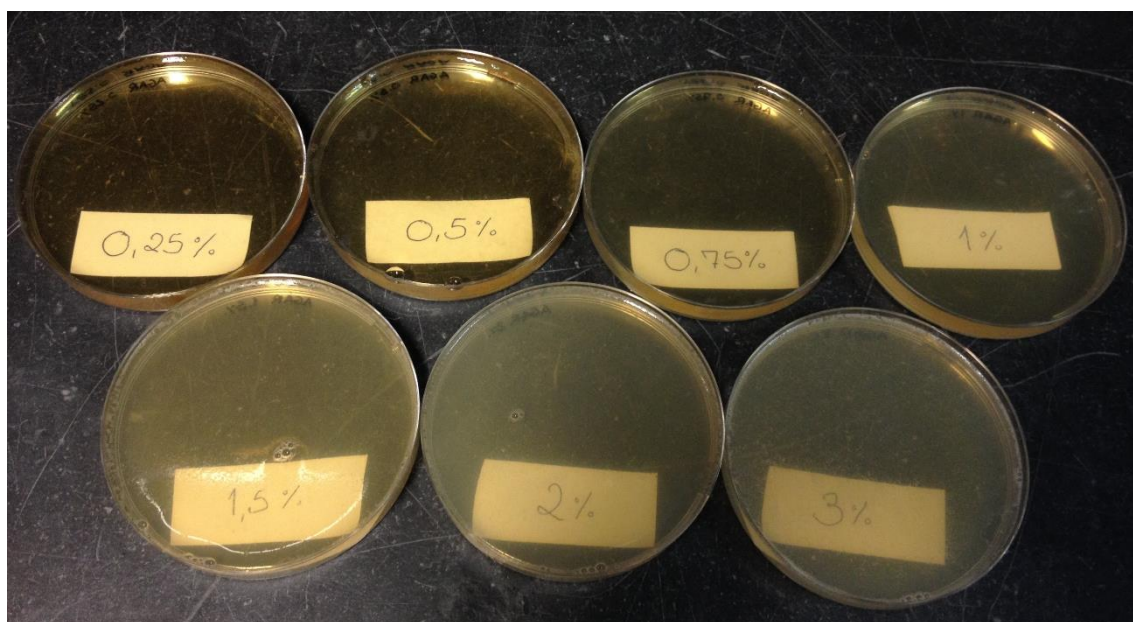


## 4.2.2 Géis de Kombucha

### 4.2.2.1 Géis com Agar

As concentrações de agar testadas correspondem às utilizadas nas aulas práticas de Hidrocolóides na Alimentação do Mestrado de Ciências Gastronómicas. Como estava previsto, o gel produzido com a menor concentração (0.25% [p/v] de agar) era muito frágil e o com a maior concentração era demasiado firme (3% [p/v] de agar). Na preparação dos géis, hidratou-se o agar em água e não diretamente em kombucha, pois o pH da bebida era de cerca de 3, e este hidrocolóide não forma géis com alimentos muito ácidos pois sofre hidrólise ácida. Tentou-se usar o mínimo possível de água (apenas o suficiente para dissolver completamente o agar) de modo a não diluir o sabor da kombucha.

Quanto ao aspeto, este era mais agradável nos géis mais fracos (nomeadamente nos de 0.25 e 0.50% [p/v] de agar), pois eram mais transparentes que os géis mais fortes que, devido à elevada concentração de agar na mistura, apresentavam maior opacidade e não eram tão apelativos (**figura 4.12**).



**Figura 4.12** Aspeto dos géis de agar. A fotografia foi tirada com um fundo escuro para se perceber a transparência dos géis.



Os géis só foram provados até ao de 1.5% (p/v) de agar, porque achou-se já a textura deste gel demasiado firme e desagradável, pelo que não se sentiu necessidade de provar os restantes. O gel de 0.25% (p/v) de agar, apesar de ser o mais apelativo visualmente e de ser o melhor em termos de sabor, era demasiado frágil e apresentava muita sinérese. O de 0.5% (p/v) foi considerado o melhor do conjunto, pois apresentava uma textura

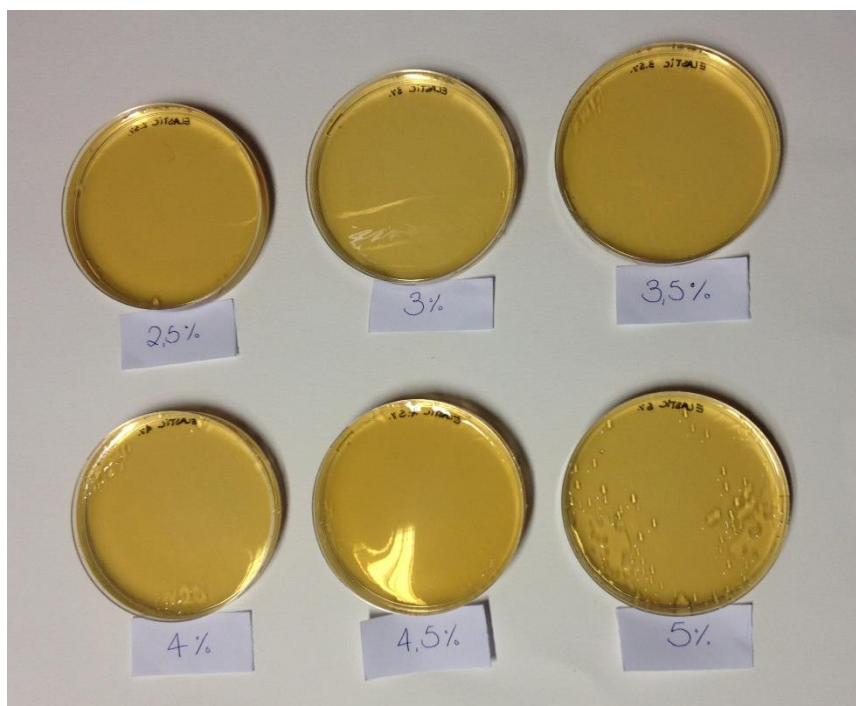


**Figura 4.13** Gomas de kombucha com agar.

agradável que se desfazia bem na boca, boa libertação de sabor e um aspeto visualmente apelativo, apesar de apresentar alguma sinérese (mas em menor grau que o gel mais fraco). O gel de 0.75% (p/v) apresentava um sabor mais fraco a kombucha, era mais friável e não apresentava sinérese. Esta concentração poderia ser adequada para a aplicação em gomas (**figura 4.13**), por exemplo, mas ter-se-ia de utilizar um preparado com um sabor mais intenso e com açúcar adicionado, pois os géis resultantes ficaram muito pouco doces. O gel de 1% (p/v) não apresentava praticamente qualquer sabor e era muito firme.

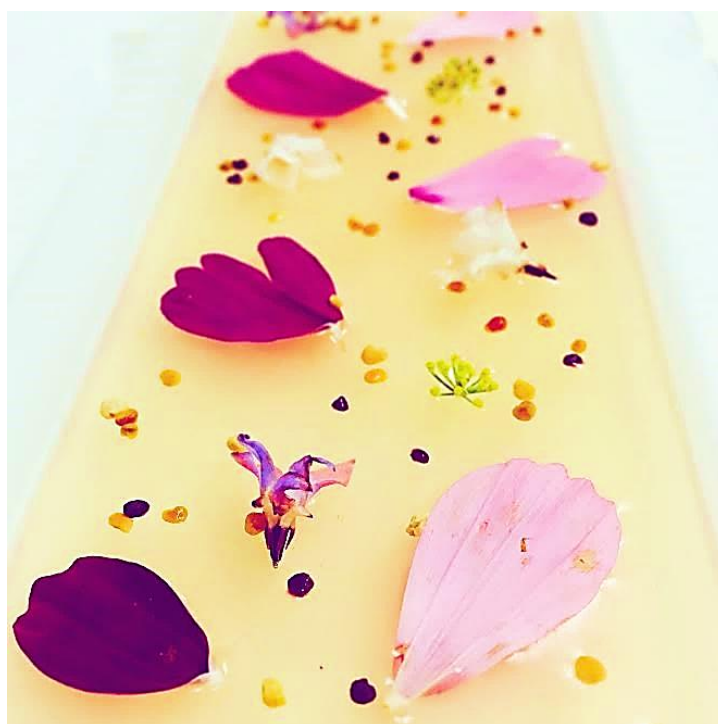
#### 4.2.2.2 Géis com Elastic

A gama de concentrações testadas para o Elastic foram baseadas nas recomendações do rótulo do produto. Todos os géis apresentaram um aroma pouco intenso, possivelmente devido ao facto de os preparados terem sido fervidos para dissolver o gelificante. Quanto ao aspeto, todos apresentaram uma cor apelativa e transparente (**figura 4.14**), a textura era também muito elástica e agradável, e não apresentaram sinérese (a água à superfície do gel de 5% de Elastic na **figura 4.14** deve-se a condensação). Quanto ao sabor, este tornava-se mais fraco quanto maior fosse a concentração de Elastic, e no geral era menos doce do que a bebida original, pelo que se aconselha a acrescentar açúcar ao preparado para se obter géis mais doces.



**Figura 4.14** Aspetto dos géis de Elastic. A fotografia foi tirada com um fundo claro para se perceber a cor dos géis.

Quanto a aplicações, determinou-se que a concentração de 2.5% de Elastic é muito boa para géis de sobremesa (gelatinas), a de 3% é indicada para véus (**figura 4.15**) e a de 5% poderá ser utilizada para a produção de gomas.



**Figura 4.15** Véus de kombucha com Elastic.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

---

Apesar da antiguidade da kombucha, este produto não se encontra ainda tão bem caracterizado relativamente a outros produtos alimentares mais comuns. Contudo é esperado que, com a crescente popularidade desta bebida, se note um aumento nos trabalhos de investigação em torno da kombucha. Este produto é geralmente consumido pelos seus alegados efeitos benéficos e, de facto, esta bebida apresenta bastante potencial de acordo com os estudos já realizados. Porém, os compostos ativos nela presentes e os seus mecanismos de ação precisam ainda de ser caracterizados em modelos humanos.

Apesar de já terem sido realizados vários estudos acerca deste produto fermentado, a microbiota essencial da kombucha é quase uma incógnita, sendo que é necessário ainda compreender como os microrganismos interagem entre si, qual a sua proporção, o seu papel e quais são fundamentais para o perfil de *flavour* desta bebida.

Neste trabalho foram identificados quatro microrganismos diferentes da kombucha analisada, três leveduras (*Candida californica*, *Zygosaccharomyces rouxii* e *Metschnikowia pulcherrima*) e uma bactéria acética do género *Acetobacter*. Esta bactéria não formou película celulósica à superfície do chá e as bactérias acéticas subsequentemente encomendadas também não foram bem sucedidas nesta tarefa. Assim sendo, não foi possível a criação de um inóculo que fosse capaz de produzir uma kombucha semelhante àquela resultante da mistura das culturas K3 (LBM, ISA-UL) e KB (Braga) em chá preto.

Embora não tenha sido realizada uma análise detalhada do aroma da kombucha produzida, quer por métodos instrumentais, quer por métodos sensoriais (com um painel treinado), este seria um estudo interessante a realizar no seguimento do presente trabalho. A análise sensorial aqui realizada teve como alvo potenciais consumidores, pelo que se estudou apenas a aceitação e preferência dos produtos apresentados. Os resultados

demonstraram que o consumidor prefere uma bebida com um bom equilíbrio em termos de doçura e acidez.

Esta bebida é comercializada em alguns países de diferentes formas. Não só como uma bebida funcional, mas também como um refrigerante. Em Portugal, a kombucha é vendida em estabelecimentos comerciais ditos “biológicos”, e a bebida é comercializada como um alimento funcional. Não existem muitas marcas disponíveis no mercado, portanto é um campo a ser explorado. Contudo, existem já muitas pessoas em Portugal a produzir kombucha a nível caseiro e devido à falta de informação disponível na língua portuguesa, muitas vezes os indivíduos recorrem às redes sociais para pedir informações. É então importante criar iniciativas em eventos abertos ao público geral onde haja a divulgação de informação acerca deste produto de modo a, não só criar uma comunidade informada, como também para dar a conhecer esta bebida que ainda é tão desconhecida no país.

Para além do consumo da kombucha como bebida, é possível a sua utilização em outros tipos de preparações culinárias. A película celulósica pode ser preparada e utilizada como *topping* de bebidas e sobremesas na forma de *nata de kombucha*; o líquido fermentado pode ser transformado em gel para ser consumido como uma sobremesa, e eventualmente poderá também ser utilizado para a elaboração de um *sorbet* de kombucha, entre outras aplicações. É uma questão de tempo até este produto fermentado começar a ser usado de forma corrente na área da restauração.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] **Ahmed S., Stepp J.R. 2013.** Chapter 2 – Green Tea: Plants, Processing, Manufacturing and Production *em* V. Preedy (ed.), *Tea in Health and Disease Prevention*, págs. 19-31. Academic Press. ISBN: 9780123849373.
  
- [2] **Harbowy M.E., Balentine D.A. 1997.** *Tea Chemistry*. [Critical Reviews in Plant Sciences](#). [16\(5\): 415-80](#).
  
- [3] **McGee H. 2004.** *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen*, págs. 435-41. Scribner, Nova Iorque, EUA. ISBN: 1416556370.
  
- [4] **Weisburger J.H. 1997.** *Tea and health: a historical perspective*. [Cancer Letters](#). [114\(1-2\): 315-7](#).
  
- [5] **Chen M.-L. 2002.** 1. Tea and Health – An Overview *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 1-16, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277 [ebook].
  
- [6] **Heiss M.L., Heiss R.J. 2007.** *The Story of Tea: A Cultural History and Drinking Guide*. Ten Speed Press, Nova Iorque, EUA. ISBN: 9781607741725 [ebook].
  
- [7] **Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. 2009.** *Food Chemistry*, 4ª edição, págs. 951-8. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Alemanha. ISBN: 9783540699330.
  
- [8] **Wang H.-F., You X.-Q., Chen Z.-M. 2002.** 5. The Chemistry of Tea Volatiles *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 89-120, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277 [ebook].
  
- [9] **Dufresne C., Farnworth E. 2000.** *Tea, Kombucha, and health: a review*. [Food Research International](#), [33\(6\): 409-21](#).
  
- [10] **Chen Z.-M. 2002.** 8. The Effects of Tea on the Cardiovascular System *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 151-67, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277 [ebook].
  
- [11] **Cheng S.-J. 2002.** 10. Anticarcinogenic Activity of Tea *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 193-210, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277 [ebook].

- [12] **Zhen Y.-S. 2002.** 11. Antitumor Activity of Tea Products *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 211-29, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277 [ebook].
- [13] **Tao P.-Z. 2002.** 9. Antimicrobial Activity of Tea Products *em* Y.-S. Zhen (ed.), *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*, págs. 169-92, Taylor & Francis. ISBN: 0203301277 [ebook].
- [14] **Lacasse, D. 1995.** *Introdução à Microbiologia Alimentar*, traduzido por P. Seixas, págs. 560-1, Instituto Piaget, Lisboa, Portugal. ISBN: 9727711022.
- [15] **Jayabalan R., Malbaša R.V., Lončar E.S., Vitas J.S., Sathishkumar M. 2014.** *A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus*. [Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 13\(4\): 538-50.](#)
- [16] **Kaufmann K. 2013.** *Kombucha Rediscovered: The Medicinal Benefits of an Ancient Healing Tea*. Books Alive, Tennessee, EUA. ISBN: 9780920470763 [ebook].
- [17] **Pedersen J.A. 2013.** *Kombucha: a tasty Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts* *em* Nordic Food Lab, <http://nordicfoodlab.org/blog/2013/2/komboooucha> [última consulta em 08/02/2016].
- [18] **Broome T. 2015.** *Kombucha: The Tea of Immortality* *em* Fift Season Gardening, <http://fifthseasongardening.com/kombucha-the-tea-of-immortality> [última consulta em 08/02/2016].
- [19] **Srinivasan R., Smolinske S., Greenbaum D. 1997.** *Probable Gastrointestinal Toxicity of Kombucha Tea. Is This Beverage Healthy or Harmful?* [Journal of General Internal Medicine, 12\(10\): 643-4.](#)
- [20] **Mayser P., Fromme S., Leitzmann C., Gründer K. 1995.** *The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'.* [Mycoses, 38\(7-8\): 289-95.](#)
- [21] **Teoh A.L., Heard G., Cox J. 2004.** *Yeast ecology of Kombucha fermentation.* [International Journal of Food Microbiology, 95\(2\): 119-26.](#)
- [22] **Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. 2014.** *Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples.* [Food](#)

- [Microbiology, 38: 171-8.](#)
- [23] **Ramadani A.S., Abulreesh H.H. 2010.** *Isolation and Identification of Yeast Flora in Local Kombucha Sample: Al Nabtah.* Umm Al-Qura University Journal of Applied Sciences, 2(1): 42-51.
- [24] **Kurtzman C.P., Robnett C.J., Basehoar-Powers E. 2001.** *Zygosaccharomyces kombuchaensis, a new ascosporeogenous yeast from 'Kombucha tea'.* [FEMS Yeast Research, 1\(2\): 133-8.](#)
- [25] **Nguyen V.T., Flanagan B., Gidley M.J., Dykes G.A. 2008.** *Characterization of Cellulose Production by a Gluconacetobacter xylinus Strain from Kombucha.* [Current Microbiology, 57\(5\): 449-53.](#)
- [26] **Boesch C., Trček J., Sievers M., Teuber M. 1998.** *Acetobacter intermedius, sp. nov.* [Systematic and Applied Microbiology, 21\(2\): 220-9.](#)
- [27] **Dutta D., Gachhui R. 2006.** *Novel nitrogen-fixing Acetobacter nitrogenifigens sp. nov., isolated from Kombucha tea.* [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56\(8\): 1899-903.](#)
- [28] **Dutta D., Gachhui R. 2007.** *Nitrogen-fixing and cellulose-producing Gluconacetobacter kombuchae sp. nov., isolated from Kombucha tea.* [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57\(2\): 353-7.](#)
- [29] **Cabral S., Prista C., Loureiro-Dias M.C., Leandro M.J. 2015.** *Occurrence of FFZ genes in yeasts and correlation with fructophilic behaviour.* [Microbiology, 161\(10\): 2008-18.](#)
- [30] **Chen C., Liu B.Y. 2000.** *Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation.* [Journal of Applied Microbiology, 89\(5\): 834-9.](#)
- [31] **Sievers M., Lanini C., Weber A., Schuler-Schmid U., Teuber M. 1995.** *Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation.* [Systematic and Applied Microbiology, 18\(4\): 590-4.](#)
- [32] **Jayabalan R., Marimuthu S., Swaminathan K. 2007.** *Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation.* [Food Chemistry, 102\(1\): 392-8.](#)

- [33] **Blanc P.J. 1996.** *Characterization of the tea fungus metabolites.* [Biotechnology Letters, 18\(2\): 139-42.](#)
- [34] **Malbaša R.V., Lončar E.S., Kolarov L.J. A. 2001.** *Sucrose and Inulin Balance During Tea Fungus Fermentation.* *Romanian Biotechnological Letters*, 7(1): 573-6.
- [35] **Jayabalan R., Malini K., Sathishkumar M., Swaminathan K., Yun S.-E. 2010.** *Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation.* [Food Science and Biotechnology, 19\(3\): 843-7.](#)
- [36] **Steinkraus K.H., Shapiro K.B., Hotchkiss J.H., Mortlock R.P. 1996.** *Investigations into the Antibiotic Activity of Tea Fungus/Kombucha Beverage.* [Acta Biotechnologica, 16\(2-3\): 199-205.](#)
- [37] **Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W. 2000.** *Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity.* [Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48\(6\): 2586-94.](#)
- [38] **Battikh H., Chaieb K., Bakhrouf A., Ammar E. 2013.** *Antibacterial and Antifungal Activities of Black and Green Kombucha Teas.* [Journal of Food Biochemistry, 37\(2\): 231-6.](#)
- [39] **Chu S.-C., Chen C. 2006.** *Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha.* [Food Chemistry, 98\(3\): 502-7.](#)
- [40] **Jayabalan R., Subathradevi P., Marimuthu S., Sathishkumar M., Swaminathan K. 2008.** *Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation.* [Food Chemistry, 109\(1\): 227-34.](#)
- [41] **Malbaša R.V., Lončar E.S., Vitas J.S., Čanadanović-Brunet J.M. 2011.** *Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage.* [Food Chemistry, 127\(4\): 1727-31.](#)
- [42] **Murugesan G.S., Sathishkumar M., Jayabalan R., Binupriya A.R., Swaminathan K., Yun S.E. 2009.** *Hepatoprotective and Curative Properties of Kombucha Tea Against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity.* [Journal of Microbiology and Biotechnology, 19\(4\): 397-402.](#)
- [43] **Bhattacharya S., Gachhui R., Sil P.C. 2011.** *Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis.* [Patophysiology, 18\(3\): 221-34.](#)



- [44] Wang Y., Ji B., Wu W., Wang R., Yang Z., Zhang D., Tian W. 2013. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. [Journal of the Science of Food and Agriculture](#), 94(2): 265-72.
- [45] Jayabalan R., Chen P.-N., Hsieh Y.-S., Prabhakaran K., Pitchai P., Marimuthu S., Thangaraj P., Swaminathan K., Yun S.E. 2011. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells – Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. [Indian Journal of Biotechnology](#), 10(1): 75-82.
- [46] Srihari T., Arunkumar R., Arunakaran J., Satyanarayana U. 2013. Downregulation of signaling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). [Biomedicine & Preventive Nutrition](#), 3(1): 53-8.
- [47] Shenoy C. 2000. Hypoglycemic activity of bio-tea in mice. [Indian Journal of Experimental Biology](#), 38(3): 278-9.
- [48] Hartmann A.M., Burleson L.E., Holmes A.K., Geist C.R. 2000. Effects of Chronic Kombucha Ingestion on Open-field Behaviors, Longevity, Appetite Behaviors, and Organs ins C57-BL/6 Mice: A Pilot Study. [Nutrition](#), 16(9): 755-61.
- [49] Yang Z.-W., Ji B.-P., Zhou F., Li B., Luo Y., Yang L., Li T. 2008. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. [Journal of the Science of Food and Agriculture](#), 89(1): 150-6.
- [50] Kallel L., Desseaux V., Hamdi M., Stocker P., Ajandouz E.H. 2012. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. [Food Research International](#), 49(1): 226-32.
- [51] Kozyrovska N.O., Reva O.M., Goginyan V.B., de Vera J.-P. 2012. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. [Biopolymers and Cell](#), 28(2): 103-13.
- [52] Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Unexplained Severe Illness Possibly Associated with Consumption of Kombucha Tea -- Iowa, 1995. Morbidity and Mortality Weekly Report, 44(48): 892-3, 899-900. Disponível online em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00039742.htm> [última consulta em 11/01/2016].
- [53] Kole A.S.H., Jones H.D., Christensen R., Gladstein J. 2009. A Case of Kombucha Tea

- Toxicity. [Journal of Intensive Care Medicine, 24\(3\): 205-7.](#)
- [54] **Cvetković D.D., Markov S.L. 2002.** *Cultivation of Tea Fungus on Malt Extract Medium.* Acta Periodica Technologica, 2002(33): 117-26.
- [55] **Milanović S.D., Lončar E.S., Đurić M.S., Malbaša R.V., Tekić M.N., Ilić M.D., Duraković K.G. 2008.** *Low Energy Kombucha Fermented Milk-Based Beverages.* Acta Periodica Technologica, 2008(39): 37-46.
- [56] **Malbaša R.V., Milanović S.D., Lončar E.S., Djurić M.S., Carić M.Đ., Ilić M.D., Kolarov L. 2009.** *Milk-based beverages obtained by Kombucha application.* [Food Chemistry, 112\(1\): 178-84.](#)
- [57] **Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R.M. Jr. 2006.** *Microbial cellulose – the natural power to heal wounds.* [Biomaterials, 27\(2\): 145-51.](#)
- [58] **STBX Studios.** *Nata De Coco Fondant Factory (Photography),* <http://www.stbxstudios.com/nata-de-coco-fondant-factory/> [última consulta em 08/02/2016].
- [59] **Murugesan G.S., Sathishkumar M., Swaminathan K. 2006.** *Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass.* [Bioresource Technology, 97\(3\): 483-7.](#)
- [60] **Mamisahebei S., Khaniki G.R.J., Torabian A., Nasser S., Naddafi K. 2007.** *Removal of Arsenic from an Aqueous Solution by Pretreated Waste Tea Fungal Biomass.* [Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering, 4\(2\): 85-92.](#)
- [61] **Šćiban M.B., Prodanović J.M., Razmovski R.N. 2012.** *Biosorption of Copper(II) and Chromium(VI) by Modified Tea Fungus.* Acta Periodica Technologica, 2012(43): 335-42.
- [62] **Zhu C., Li F., Zhou X., Lin L., Zhang T. 2014.** *Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation.* [Journal of Biomedical Materials Research Part A, 102\(5\): 1548-57.](#)
- [63] **Murugesan G.S., Sathishkumar M., Swaminathan K. 2005.** *Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks.* [Bioresource Technology, 96\(16\): 1743-8.](#)

- [64] *About Suzanne Lee* em TED, <http://www.ted.com/profiles/732127> [última consulta em 08/02/2016].
- [65] **Lee S. 2011.** *Grow your own clothes* em TED, [http://www.ted.com/talks/suzanne\\_lee\\_grow\\_your\\_own\\_clothes](http://www.ted.com/talks/suzanne_lee_grow_your_own_clothes) [última consulta em 08/02/2016].
- [66] **British Science Association. 2012.** *Secret Scientist: Suzanne Lee* em I, Science, <http://www.isciencemag.co.uk/features/suzanne-lee/> [última consulta em 08/02/2016].
- [67] “Kombucha” em Google Trends, <http://www.google.com/trends/explore#cmpt=q&geo&q=kombucha> [última consulta em 04/02/2016].
- [68] **Narula S.K. 2015.** *The American kombucha craze, in one home-brewed chart* em Quartz, <http://qz.com/368513/the-american-kombucha-craze-in-one-home-brewed-chart/> [última consulta em 04/02/2016].
- [69] **Carr C. 2014.** *Kombucha cha-ching: A probiotic tea fizzes up strong growth* em CNBC, <http://www.cnbc.com/2014/08/08/kombucha-cha-ching-a-probiotic-tea-fizzes-up-strong-growth.html> [última consulta em 04/02/2016].
- [70] **Health-Ade Kombucha.** <http://health-ade.com/> [última consulta em 04/02/2016].
- [71] **McLaughlin A. 2010.** *really.important.* em Edible Perspective [blog], <http://www.edibleperspective.com/home/2010/5/13/reallyimportant.html> [última consulta em 04/02/2016].
- [72] **Live Soda Kombucha.** <http://livesodakombucha.com/> [última consulta em 04/02/2016].
- [73] **Reed's Inc.** *Reed's Culture Club Kombucha*, <http://reedsinc.com/product/reeds-culture-club-kombucha-goji-ginger/> [última consulta em 04/02/2016].
- [74] **Sharp E. 2015.** *Australia's first kombucha bar comes to Sydney!* em Sporteluxe, <http://www.sporteluxe.com/australias-first-kombucha-bar-comes-to-sydney/> [última consulta em 04/02/2016].
- [75] **Xaté Kombucha.** <http://www.xatedrinks.com/kombucha/> [última consulta em 04/02/2016].

04/02/2016].

- [76] **Pincus D.H., Orenga S., Chatellier S. 2007.** *Yeast identification – past, present, and future methods.* [Medical Mycology, 45\(2\): 97-121.](#)
- [77] **Larena I., Salazar O., González V., Julián M.C., Rubio V. 1999.** *Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes.* [Journal of Biotechnology, 75\(2-3\): 187-94.](#)
- [78] **Poblet M., Rozès N., Guillamón J.M., Mas A. 2000.** *Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA.* [Letters in Applied Microbiology, 31\(1\): 63-7.](#)
- [79] **Sambrook J., Russel W.D. 2001.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual – Volume 2, 3ª edição, págs. 8.4-8.17,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, EUA. ISBN: 0879695765.
- [80] **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008.** *Molecular Biology of the Cell, 5ª edição, págs. 545, 548-550,* Garland Science, Nova Iorque, EUA. ISBN: 9780815341055.
- [81] **Brown T.A. 2007.** *Genomes 3, 3ª edição, págs. 105-107,* Garland Science Publishing, Nova Iorque, EUA. ISBN: 0815341385.
- [82] **This H. 2009.** *Molecular Gastronomy, a Scientific Look at Cooking.* [Accounts of Chemical Research, 42\(5\): 575-83.](#)
- [83] **This H. 2006.** *Molecular Gastronomy: Exploring the Science of Flavor,* traduzido por M. DeBevoise, págs. 1-2, Columbia University Press, Nova Iorque, EUA. ISBN: 023113312X.
- [84] **This H. 2002.** *Molecular Gastronomy.* [Angewandte Chemie International Edition, 41\(1\): 83-8.](#)
- [85] **Fuller G.W. 2011.** *New Food Product Development. From Concept to Marketplace, 3ª edição, págs. 1-33,* CRC Press, EUA. ISBN: 9781439818657 [ebook].
- [86] **Saha D., Bhattacharya S. 2010.** *Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a*

- critical review. [Journal of Food Science and Technology](#), 47(6): 587-97.
- [87] **Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). 2009.** *Lista de Aditivos Alimentares*, disponível online em: <http://www.asae.pt/> [última consulta em 16/02/2016].
- [88] *Agar Agar (Japanese isinglass, ceylon moss, kanten)* em *Molecular Recipes*, <http://www.molecularrecipes.com/hydrocolloid-guide/agar-agar/> [última consulta em 16/02/2016].
- [89] **Imeson A. 2010.** Capítulo 3 – *Agar* em A. Imeson (ed.), *Food Stabilisers, Thickeners, and Gelling Agents*, 1ª edição, págs. 31-49, Blackwell Publishing. ISBN: 9781405132671.
- [90] **Armisen R., Galatas F. 2009.** Capítulo 4 – *Agar* em G.O. Phillips e P.A. Williams (eds.), *Handbook of Hydrocolloids*, 2ª edição, págs. 83-107, Woodhead Publishing Limited. ISBN: 9781845694142.
- [91] **Chaplin M. 2016.** *Agar* em *Water Structure and Science*. Artigo disponível online em: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/agar.html> [última consulta em 16/02/2016].
- [92] **Prajapati V.D., Maheriya P.M., Jani G.K., Solanki H.K. 2014.** *Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications*. [Carbohydrate Polymers](#), 105: 97-112.
- [93] **Blakemore W.R., Harpell A.R. 2010.** Capítulo 5 – *Carrageenan* em A. Imeson (ed.), *Food Stabilisers, Thickeners, and Gelling Agents*, 1ª edição, págs. 73-94, Blackwell Publishing. ISBN: 9781405132671.
- [94] *Iota Carrageenan, Kappa Carrageenan and Lambda Carrageenan* em *Molecular Recipes*, <http://www.molecularrecipes.com/hydrocolloid-guide/carrageenan/> [última consulta em 16/02/2016].
- [95] **Barak S., Mudgil D. 2014.** *Locust bean gum: Processing, properties and food applications – A review*. [International Journal of Biological Macromolecules](#), 66: 74-80.
- [96] *Locust Bean Gum (LBG, carob gum)* em *Molecular Recipes*, <http://www.molecularrecipes.com/hydrocolloid-guide/locust-bean-gum-lbg/> [última consulta em 21/02/2016].
- [97] **Teixeira L.V. 2009.** *Análise Sensorial na Indústria de Alimentos*. [Revista do Instituto de](#)

- [Laticínios Cândido Tostes, 366\(64\): 12-21.](#)
- [98] **Instituto Adolfo Lutz. 2008.** *Métodos físico-químicos para análise de alimentos.* O. Zenebon, N.S. Pascuet, P. Tiglea (coordenadores), 4ª edição / 1ª edição digital, págs. 281-320, IAL, São Paulo, Brasil.
- [99] **Elbing K., Brent R. 2003.** *UNIT 1.2 Growth in Liquid Media* em F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, pág. 1.2.2, John Wiley & Sons Inc., Nova Jersey, EUA. ISBN: 047150338X.
- [100] **Treco D.A., Winston F. 2003.** *UNIT 13.2 Growth and Manipulation of Yeast* em F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, pág. 13.2.1, John Wiley & Sons Inc., Nova Jersey, EUA. ISBN: 047150338X.
- [101] **Akada R., Murakane T., Nishizawa Y. 2000.** *DNA extraction method for screening yeast clones by PCR.* [BioTechniques, 28\(4\):668-70, 672, 674.](#)
- [102] **Millar B.C., Jiru X., Moore J.E., Earle J.A.P. 2000.** *A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material.* [Journal of Microbiological Methods, 42\(2\):139-47.](#)
- [103] **Camilo S.F. 2014.** *Origem e Disseminação dos Microrganismos do Vinho.* Lisboa, ISA-UL [Dissertação de Mestrado].
- [104] **Castro F., Sumague J., Villa D.** *How to Produce Nata de Coco.* Technology and Livelihood Resource Center. Documento disponível online em: <http://www.southpacificbiz.net/library/docs/howto/How%20to%20Produce%20Nata%20de%20Coco.pdf> [última consulta em 22/02/2016].
- [105] **Katz S.E. 2012.** *The Art of Fermentation: An In-Depth Exploration of Essential Concepts and Processes from Around the World*, págs. 962-6. Chelsea Green Publishing Co., Vermont, EUA. ISBN: 9781603583640 [ebook].
- [106] **El-Salam S.S.A. 2012.** *16S rRNA Gene Sequence Detection of Acetic Acid Bacteria Isolated from Tea Kombucha.* [New York Science Journal, 5\(3\): 55-61.](#)
- [107] **Raspor P., Goranovič D. 2008.** *Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria.*

- [Critical Reviews in Biotechnology, 28\(2\): 101-24.](#)
- [108] Cycloheximide em Sigma-Aldrich®, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c7698> [última consulta em 26/02/2016].
- [109] Jia S., Ou H., Chen G., Choi D.-B., Cho K.-A., Okabe M., Cha W.S. 2004. *Cellulose Production from Gluconobacter oxydans TQ-B2*. [Biotechnology and Bioprocess Engineering, 9 \(3\):166-170.](#)
- [110] Iyer P.R., Catchmark J., Brown N.R., Tien M. 2011. *Biochemical localization of a protein involved in synthesis of Gluconacetobacter hansenii cellulose*. [Cellulose, 18\(3\): 739-47.](#)
- [111] Dayal M.S., Goswami N., Sahai A., Jain V., Mathur G., Mathur A. 2013. *Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from Acetobacter aceti MTCC 2623*. [Carbohydrate Polymers, 94\(1\): 12-6.](#)
- [112] Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005. *Yeast diversity in hypersaline habitats*. [FEMS Microbiology Letters, 244\(2\): 229-34.](#)
- [113] Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2006. *The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production*. South African Journal of Enology and Viticulture, 27(1): 15-39.
- [114] Zuehlke J.M., Glawe D.A., Edwards C.G. 2014. *Efficacy of Dimethyl Dicarbonate Against Yeasts Associated with Washington State Grapes and Wines*. [Journal of Food Processing and Preservation, 39\(6\): 1016-26.](#)
- [115] Türkel S., Ener B. 2009. *Isolation and Characterization of New Metschnikowia pulcherrima Strains as Producers of the Antimicrobial Pigment Pulcherrimin*. [Zeitschrift für Naturforschung C. Journal of Biosciences, 64\(5-6\): 405-10.](#)
- [116] Oro L., Ciani M., Comitini F. 2014. *Antimicrobial activity of Metschnikowia pulcherrima on wine yeasts*. [Journal of Applied Microbiology, 116\(5\): 1209-17.](#)
- [117] Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2003a. *The Use of Candida pulcherrima in Combination with Saccharomyces cerevisiae for the Production of Chenin blanc Wine*. South African Journal of Enology and Viticulture, 24(2): 63-9.
- [118] Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2003b. *The Effect of Non-Saccharomyces Yeasts*

- on Fermentation and Wine Quality*. South African Journal of Enology and Viticulture, 24(2): 55-62.
- [119] **Zott K., Thibon C., Bely M., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., Masneuf-Pomarede I. 2011.** *The grape must non-Saccharomyces microbial community: Impact on volatile thiol release.* [International Journal of Food Microbiology, 151\(2\): 210-5.](#)
- [120] **Sun S.Y., Gong H.S., Jiang X.M., Zhao Y.P. 2014.** *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines.* [Food Microbiology, 44: 15-23.](#)
- [121] **Sadieni V., Kondapalli N., Obulam V.S.R. 2012.** *Effect of co-fermentation with Saccharomyces cerevisiae and Torulaspora delbrueckii or Metschnikowia pulcherrima on the aroma and sensory properties of mango wine.* [Annals of Microbiology, 62\(4\): 1353-60.](#)
- [122] **Huang C.-H., Chang M.-T., Huang L., Chu W.-S. 2014.** *The gyrase B gene as a molecular marker to resolve interspecific relationships within the Acetobacter pasteurianus group and a novel target for species-specific PCR.* [European Food Research and Technology, 238\(1\): 27-33.](#)
- [123] **Gullo M., Caggia C., de Vero L., Giudici P. 2006.** *Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar".* [International Journal of Food Microbiology, 106\(2\): 209-12.](#)
- [124] **Wu J.J., Gullo M., Chen F.S., Giudici P. 2010.** *Diversity of Acetobacter pasteurianus Strains Isolated From Solid-State Fermentation of Cereal Vinegars.* [Current Microbiology, 60\(4\): 280-6.](#)
- [125] **Liu C.-H., Hsu W.-H., Lee F.-L., Liao C.-C. 1996.** *The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation.* [Food Microbiology, 13\(6\): 407-15.](#)
- [126] **Iino T., Suzuki R., Kosako Y., Ohkuma M., Komagata K., Uchimura T. 2012.** *Acetobacter okinawensis sp. nov., Acetobacter papaya sp. nov., and Acetobacter persicus sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan.* [The Journal of General and Applied Microbiology, 58\(3\): 235-43.](#)
- [127] **Pitiwittayakul N., Yukphan P., Sintuprapa W., Yamada Y., Theeragool G. 2014.**



*Identification of acetic acid bacteria isolated in Thailand and assigned to the genus Acetobacter by groEL gene sequence analysis.* [Annals of Microbiology, 65\(3\): 1557-64.](#)

- [128] **Chan K.Y. 2011.** *Slurping Nata de Coco at Saint's Alp Teahouse, NYC* em Serious Eats, <http://drinks.seriousseats.com/2011/06/nata-de-coco-saints-alp-teahouse-nyc.html> [última consulta em 26/02/2016].
- [129] **DiGregorio S. 2010.** *Spot's Condensed Milk Ice Cream with Nata de Coco* em The Village Voice, <http://www.villagevoice.com/restaurants/spots-condensed-milk-ice-cream-with-nata-de-coco-6578125> [última consulta em 26/02/2016].
- [130] **Moura J. 2011.** *Cozinha com Ciência e Arte*. Bertrand Editora. ISBN: 9789722523622.
- [131] **Lersch M. (editor) 2014.** *Texture. A hydrocolloid recipe collection*. Versão 3.0. Disponível online em: <http://blog.khymos.org/recipe-collection/>.



**ANEXOS**

---

## **Anexo I – Propriedades e Modo de Utilização dos Hidrocolóides Apresentados**

### **a) Agar (E406)**

#### **Propriedades**

---

- Forma géis com textura firme e quebradiça [130].
- Apresenta grande poder gelificante (muito superior ao da gelatina), portanto é capaz de formar géis a concentrações baixas [130].
- É insolúvel em água fria. São necessárias temperaturas superiores a 85°C para se proceder à sua dissolução [130].
- Solidifica a temperaturas relativamente altas (35-45°C) [130].
- Os géis de agar são termorreversíveis e só se liquefazem a temperaturas superiores a 85°C, pelo que é possível elaborar géis quentes [130].
- Os géis podem ser fundidos e gelificados várias vezes sem grandes alterações nas suas propriedades [89].
- Como os géis não derretem à temperatura corporal, a libertação de sabor é fraca, pois os compostos de sabor ficam aprisionados na matriz do gel [130].
- A diferença entre a temperatura de gelificação e a de fusão dos géis é muito grande. Este aspeto designa-se por histerese [131].
- Não forma géis com alimentos muito ácidos ( $\text{pH} < 4$ ). O pH ótimo é entre 4 e 10 [130]. A valores de pH baixos, os polissacáridos sofrem hidrólise ácida e caso se conjugue a ação de temperaturas altas, o processo é acelerado [90].
- Não gelifica se for dissolvido directamente em meios alcoólicos. O agar deve ser hidratado em água primeiro e só depois é que pode adicionar a componente alcoólica [130].
- Os géis de agar não são tão transparentes como os de gelatina. São ligeiramente opacos [88, 131].
- Também pode ser utilizado como espessante [88].
- É geralmente vendido sob a forma de um pó branco que pode ou não apresentar odor a algas. Os géis formados são transparentes e inodoros, mas poderão apresentar algum sabor.

**Modo de Utilização [130]**

---

- Aquecer até à ebulição, mexendo sempre, para garantir a boa dissolução do agar.
- Deixar o preparado arrefecer até solidificar.
- Não descartar as soluções quentes de agar para o esgoto, elas podem solidificar nos canos e, como só derretem a temperaturas muito elevadas, podem obstruí-los. Para deitar soluções de agar fora, deixá-las gelificar primeiro e depois colocá-las no lixo.

**Concentrações (p/v) habituais de utilização:**

- 0.25 % – propriedades espessantes;
- 0.5 % – géis suaves;
- 1 % – géis médios;
- 2 % – géis duros;
- 3 % – géis muito duros.

**b) Carrageninas (E407 e E407a)****Propriedades**

---

- Formam géis termorreversíveis [94].
- Solidificam a temperaturas altas, a cerca de 45°C [94].
- Géis formados com kappa carragenina são ligeiramente turvos, enquanto os géis formados com iota são transparentes [94].
- Apesar de formar géis muito firmes (exceto lambda), a libertação de sabores é bastante boa [94].
- Preparados com lambda e iota aguentam ciclos de congelação-descongelação, enquanto preparações com kappa carragenina sofrem sinérese com a congelação [93, 94].
- Géis formados com iota carragenina não sofrem sinérese [94].
- As kappa carrageninas formam géis com propriedades pseudoplásticas, o que quer dizer que a viscosidade diminui com o aumento da força aplicada (ex.: aumento da agitação). Isto significa que os géis sólidos podem ser desfeitos numa misturadora, dando origem a géis fluidos [94].
- Se uma mistura com iota carragenina for agitada, impede-se a formação do gel, mas se o preparado for deixado em repouso, formar-se-á um gel novamente [94].
- Valores de pH ótimos entre 4 e 10. É pouco estável em misturas muito ácidas e recomenda-se a adição da componente ácida depois da dispersão e hidratação das carrageninas [94].
- Iota é insolúvel em preparações com elevadas concentrações de açúcar (50% [p/v]) e kappa é insolúvel a concentrações elevadas de sais (10% [p/v]) [93].

- Iota e kappa podem ser usadas em esferificações diretas e inversas com sais de cálcio e potássio, respetivamente [131].

### Modo de Utilização

---

- **Kappa e iota:** Dispersar em água fria com o auxílio de uma varinha mágica. Aquecer até dissolver completamente [94, 130]. Deixar arrefecer para que o gel se forme. Se a concentração de iões cálcio ou potássio for aumentada, formam-se géis mais fortes a temperaturas mais elevadas e a concentrações mais baixas de carrageninas.
- **Lambda:** Dissolve facilmente em líquidos frios, portanto basta ser adicionada à solução que se pretende espessar [94].

### Concentrações (p/v) habituais de utilização das carrageninas [94]:

- **Kappa:** 0.02 – 1.5 % para espessar; > 1.5 % para formar géis.
- **Iota:** 0.02 – 1 % para espessar; 1 – 1.5 % para formar géis.

## c) Goma de Alfarroba (E410)

### Propriedades

---

- Sabor neutro [130].
- Espessante que forma soluções viscosas e pseudoplásticas [96].
- Estável após congelação-descongelação [96].
- pH ótimo entre 4 e 7, mas apresenta boa estabilidade fora deste intervalo [96, 131].
- Forma sinergias com outros hidrocolóides como xantano e kappa carragenina, produzindo géis elásticos que não sofrem sinérese [96].

**Modo de Utilização**

---

- Dispersar em água fria e aquecer até dissolver completamente [130].
- A viscosidade das misturas aumenta à medida que vão arrefecendo [96].

**Concentrações (p/v) habituais de utilização da goma de alfarroba:** 0.1 a 1 % para a maior parte das aplicações [96].

## Anexo II – Ficha de Prova da Análise Sensorial

### a) Parte I

Idade: _____	Sexo: M <input type="checkbox"/>   F <input type="checkbox"/>	Data: _____
--------------	---	-------------

---

**Objetivo:** Avaliação da preferência entre duas amostras de kombucha (chá fermentado).

**Códigos das amostras apresentadas:** \_\_\_\_\_

**Qual das amostras prefere?** \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## b) Parte II

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: M ☐ | F ☐

Data: \_\_\_\_\_

**Objetivo:** Avaliação hedônica e das características de cada uma das amostras de kombucha (chá fermentado).

Amostra: \_\_\_\_\_

Classifique cada um dos seguintes parâmetros:

	Muito desagradável	Desagradável	Indiferente	Agradável	Muito agradável
Aspetto					
Aroma					
Sabor					
Apreciação global					

Classifique a intensidade de cada um dos atributos relacionados com o aroma:

	Não perceptível	Muito pouco	Pouco	Suficiente	Muito	Demasiado
Doce						
Frutado						
Floral						
Avinagrado						
Fermentado						

Classifique a intensidade de cada um dos atributos relacionados com o sabor:

	Não perceptível	Muito pouco	Pouco	Suficiente	Muito	Demasiado
Doce						
Ácido						
Gás						

Intenção de compra:

De certeza que não compraria	Provavelmente não compraria	Não sei se compraria	Provavelmente compraria	De certeza que compraria

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

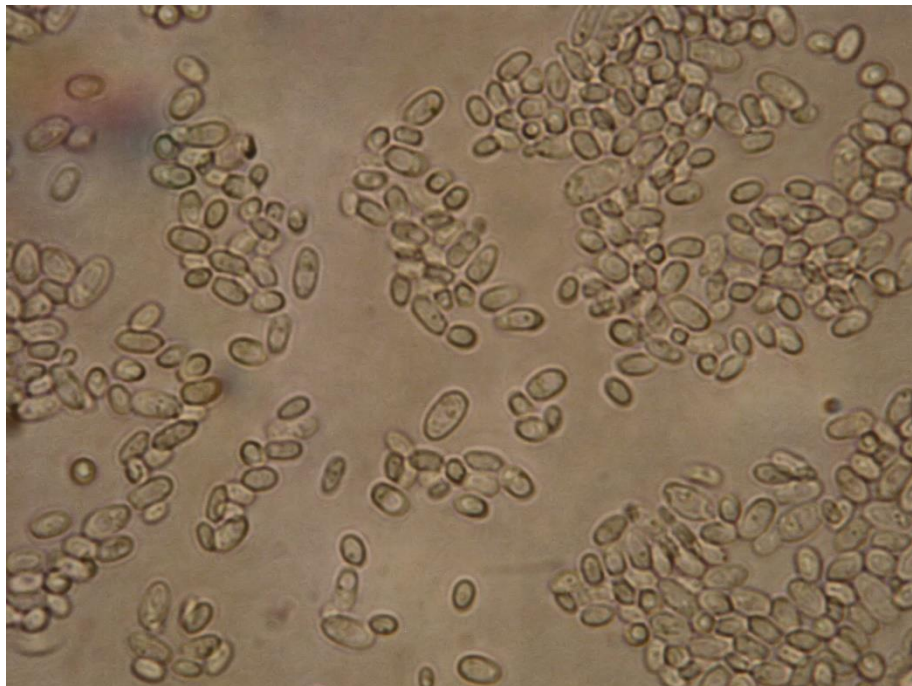
\_\_\_\_\_

## Anexo III - Observações Macro e Microscópicas dos Microrganismos Isolados

### a) Levedura 1



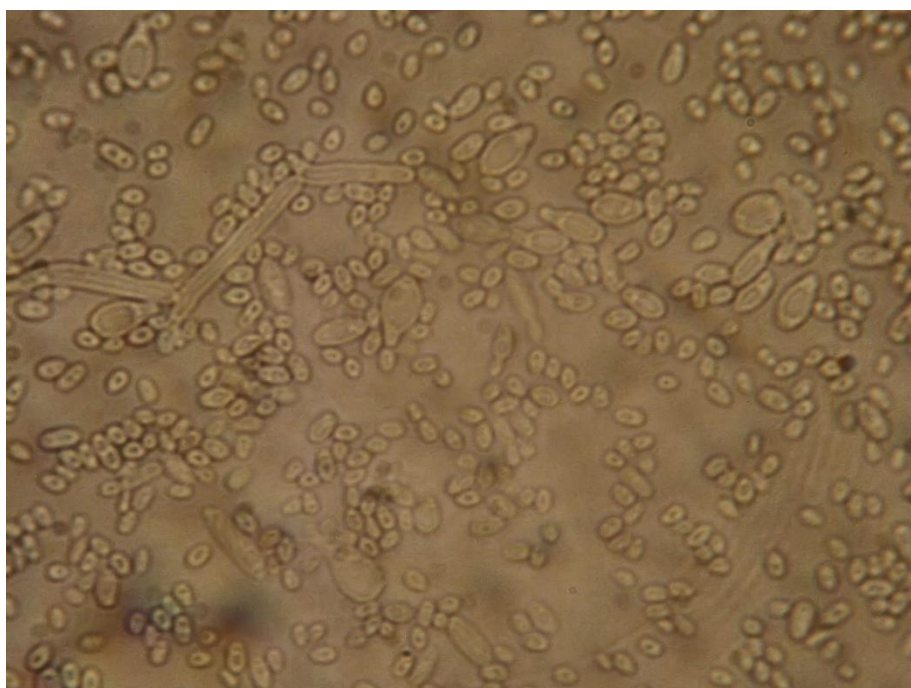
Colônias com coloração creme, baças e opacas, com superfície lisa, forma circular irregular e elevação umbilicada, margem inteira e consistência muito cremosa.



Fotografia captada de um microscópio ótico, a uma ampliação de 1000×.

**b) Levedura 2**

Colônias com coloração branca, baças e opacas, com superfície lisa, forma circular e elevação umbilicada, margem inteira e consistência cremosa.

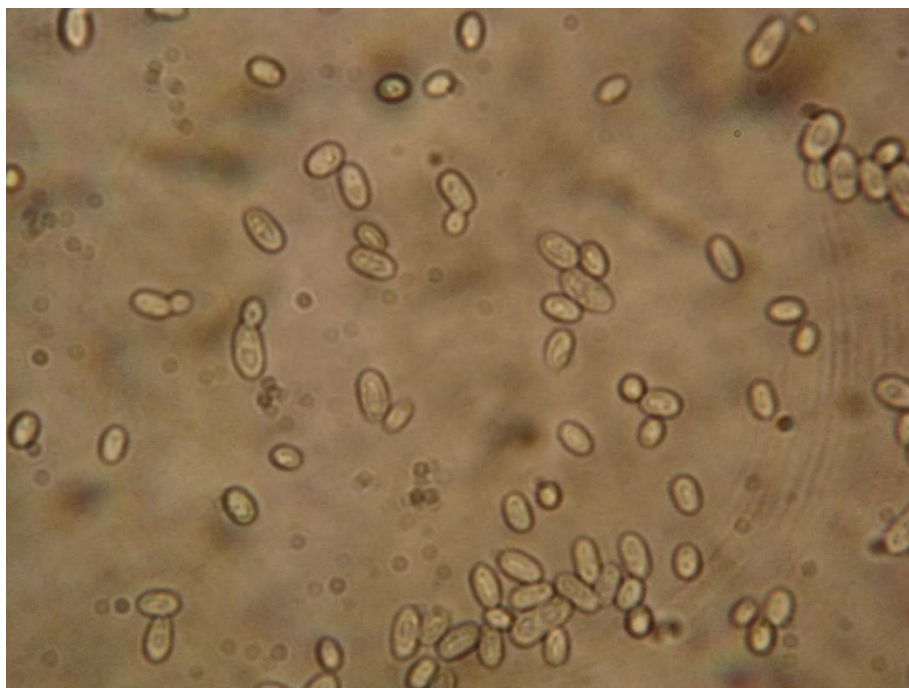


Fotografia captada de um microscópio ótico, a uma ampliação de 1000×.

**c) Levedura 3**



Colónias com coloração creme, baças e opacas, com superfície lisa, forma circular e margem inteira.

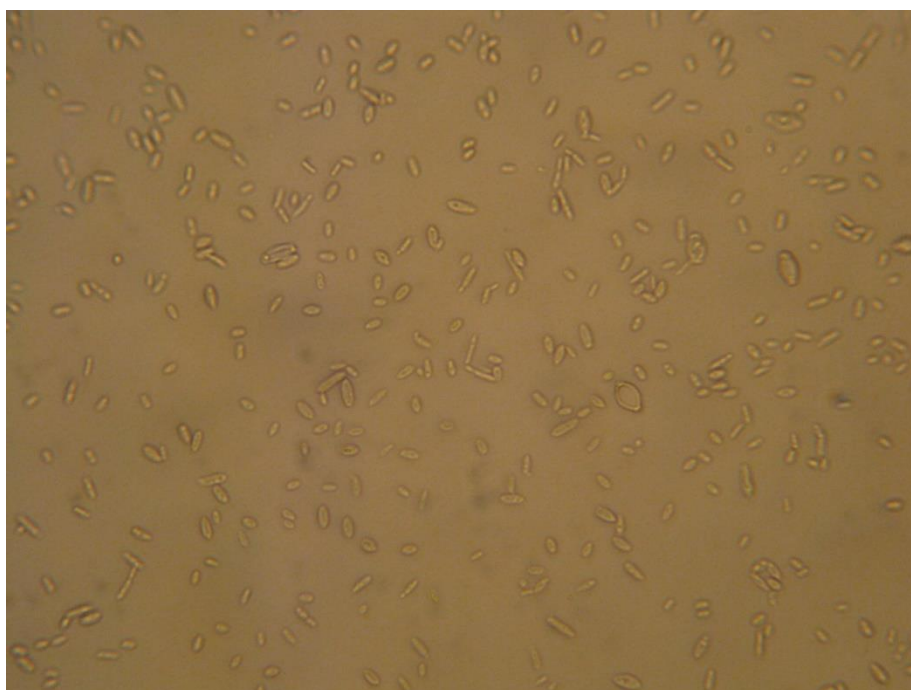


Fotografia captada de um microscópio ótico, a uma ampliação de 1000×.



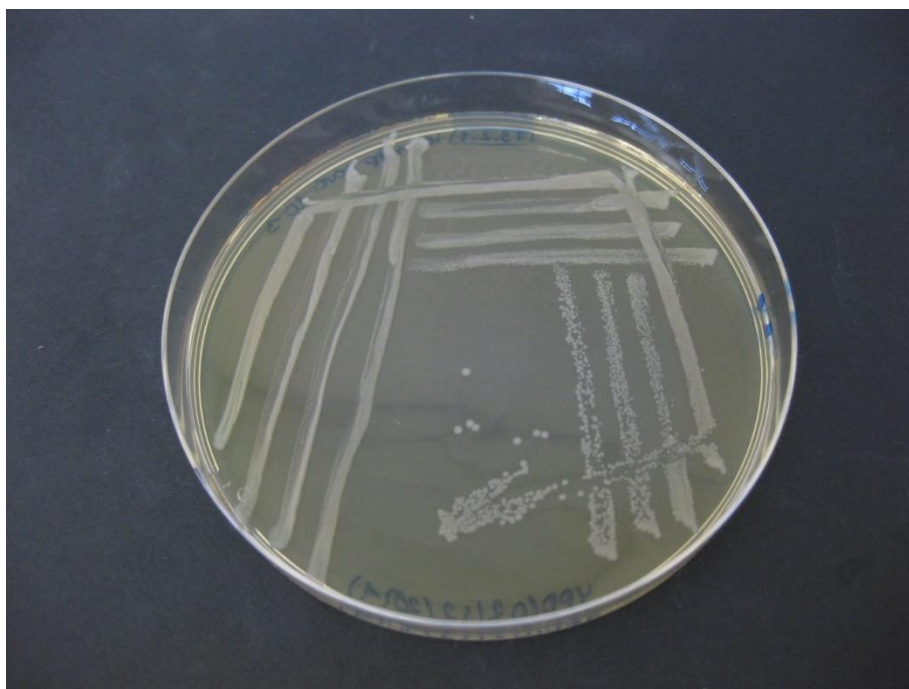
**d) Levedura 4**

Colônias com coloração branca, baças e opacas, com superfície lisa, forma circular e elevação convexa, margem inteira e consistência muito viscosa.

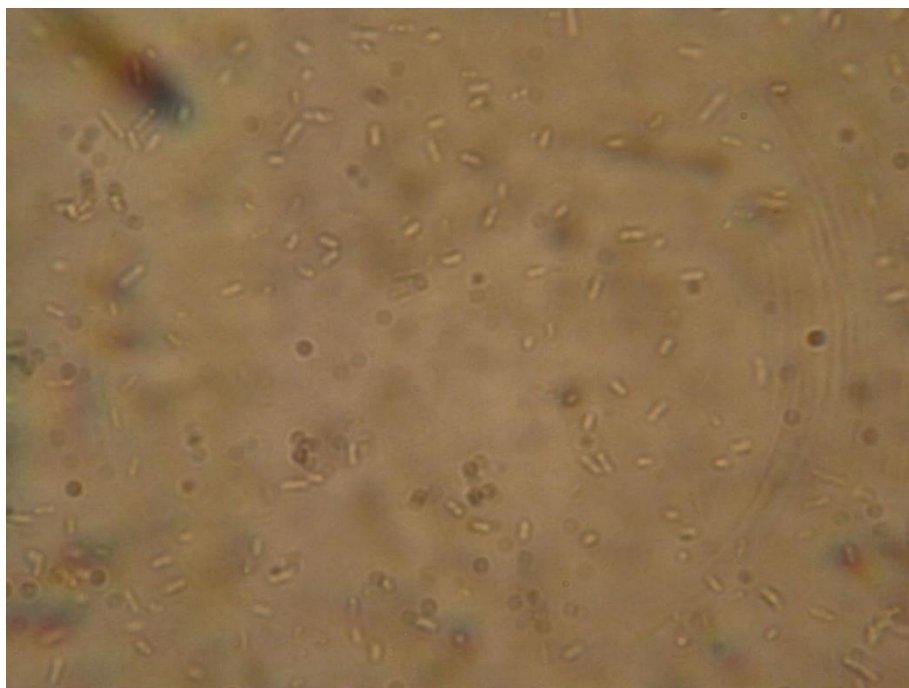


Fotografia captada de um microscópio ótico, a uma ampliação de 400×.

**e) Bactéria 1**



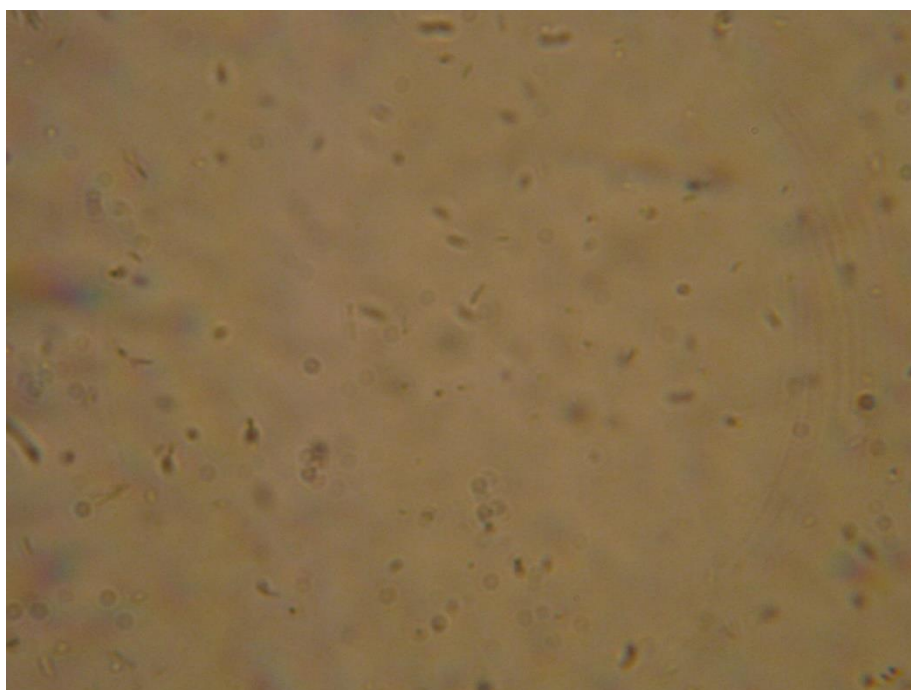
Colônias com coloração esbranquiçada, brilhantes e translúcidas, com forma circular, planas e com margem dentada.



Fotografia captada de um microscópio ótico, a uma ampliação de 1000×.

**f) Bactéria 2**

Colônias com coloração esbranquiçada, brilhantes, ligeiramente opacas no centro e mais translúcidas nas bordas, com forma circular, planas e com margem inteira.



Fotografia captada de um microscópio ótico, a uma ampliação de 1000×.

## Anexo IV – Resultados das Sequenciações de DNA Genômico dos Microrganismos Isolados

### a) Levedura 1

Com o *primer ITS4*

```
GGTTCTACCTGATCTGAGGTCGAGCTTGTTAATGTTCTCGGCGGCCAAGCGTCCTGTTTCTAGTTCGCTCAGCCCGCA
ACGTTTCTTTTCGGCGGGGCCAGCGGCCGGGCCATGTCTAACACTACGTGTTAAGAAGGAAACGACGCTCAGACAGGC
ATGCCCCCGGAATACCGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGT
ATCGCATTTTCGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTAAACTTTGTATGT
TTGAAGCTGGTATTATGGTTGATGTGTTTGTGCGCCACGTGTGTGGATGTTTATATCACAGTAATGATCCTTCCGC
AGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAAAATAAA
```

Com o *primer ITS5*

```
CTAAGGGGACTGCGGAGGACATTACTGTGATATAAACATCCACACACGTGGGCGCAACAAACACATCAACCATAATAC
CAGCTTCAAACATACAAAGTTTAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCG
AAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCGGTATTCC
GGCGGGCATGCCTGCTGAGCGTCGTTTCCCTTCTTAACACGTAGTGTGTTAGACATGGCCCGGCCGCTGGCCCGCCGAA
AAGAAACGTTGCGGGCTGAGCGAACTAGAAACAGGACGCTTGGCCGCCGAGAACATTAACAAGCTCGACCTCAGATCA
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGAGGGAGGAAAACCC
```

### b) Levedura 2

Amostra 10<sup>0</sup>, banda de 400-600 pb, com o *primer ITS4*

```
TTCTACCTGATCTGAGGTCGAGCTTGTTAATGTTCTCGGCGGCCAAGCGTCCTGTTTCTAGTTCGCTCAGCCCGCAAC
GTTTCTTTTCGGCGGGGCCAGCGGCCGGGCCATGTCTAACACTACGTGTTAAGAAGGAAACGACGCTCAGACAGGCAT
GCCCGCCGGAATACCGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTAT
CGCATTTTCGCTGCGCTCTTCAACGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTTAAACTTTGTATGTTT
GAAGCTGGTATTATGGTTGATGTGTTTGTGCGCCACGTGTGTGGATGTTTATATCACAGTAATGATCCTTCCGCAG
GTTACCTACGGAACCTTGTTACGATTTTACTTCCACACTTGT
```

Amostra 10<sup>0</sup>, banda de 400-600 pb, com o *primer ITS5*

```
NNNNNNNNNNNTNNNNNGCGNNANNNTCATTACTGTGATATAAACATCCACACACGTGGGCGCAACAAACACATCAAC
CATAATACCAGCTTCAAACATACAAAGTTTAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGA
GCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTC
GGTATTCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCCTTCTTAACACGTAGTGTGTTAGACATGGCCCGGCCGCTGGCC
CCGCCGAAAAGAAACGTTGCGGGCTGAGCGAACTAGAAACAGGACGCTTGGCCGCCGAGAACATTAACAAGCTCGACC
TCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
```

Amostra 10<sup>0</sup>, banda de 400 pb, com o *primer ITS4*

```
GGAATCTTACGAGGTTGAGGAAAGGCTGGGGCTAAACCTTATTTCTAGCGCCGTTGATATTAGGCCGAAGCAGGACCAA
ACCGGAGGTTTGAGAGTAAATATCGCTCACCCACGCATGCCCTGGGGAATACCCCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA
TTCAATGATTCACGCTGCAAGTCATATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATC
CGTTGTTGAAAGTTTTTTAATTGTGTTATTGACGGTTAAGATTTAGAGTTTGTGCCTAAAAGGGTGTAATTTCAATAT
TAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGATTTTACTTCCAAAACACGG
```

Amostra 10<sup>0</sup>, banda de 400 pb, com o *primer ITS5*

```
NNNNNNNNNACTGCGGNGATCATTAATATTGAAATTACACCCTTTTAGGCACAACTCTAAATCTTAACCGTCAATA
ACACAATTAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAAT
ATGACTTGACAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCCGGGTATTCCCCAGGGCATGCGTGGGTGA
GCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCA
GCCTTTTCTCTACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAAAGCGGAGGAAAA
```





**d) Levedura 4****Com o primer ITS4**

GGAGCCTTACGAGGGTGAGGAAAGATGGGGCTAAAACCTATTCTAGCGCCGTTGATATTAGGCCGAAGCAGGACCAAA  
CCGGAGGTTTGAGAGTAAATATCGCTCACCACGCATGCCCTGGGGAATACCCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT  
TCAATGATTACGTCTGCAAGTCATATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCC  
GTTGTTGAAAGTTTTTTGATAGAGTTATTGACGGTTAAGATTTAGAGTTTGTGCCTAAAAGGGTGTAATTTCAATATT  
AATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGATTTTTACTTCCAAACCC

**Com o primer ITS5**

GGACTGCGGAGACATTAATATTGAAATTACACACCTTTTAGGCACAACTCTAAATCTTAACCTCAATAACTCATAT  
TAAAAAAGTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTT  
GCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATCCCCAGGGCATGCGTGGGTGAGCGATAT  
TTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTATAGCCCCATTCTCT  
TCCTACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCATAAAGCGGAGGAAAAAAAAAATGGGG

**e) Bactéria 1****Com o primer AC1**

TAGCCGGGGGGCGCGGGCGCAGTGACGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTATCCATGGGTGGGGGATACATCCGG  
AAACTGGTGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTCGATTACC  
TACTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAGGCGATGATCGACAGCTGGTTTGAGAGGATTATCTGCCACACTGGACACTTAT  
ACACGGCCACACTCCTACCGGAGGCAGCCGTGGGGAATATTGTACAATGGTGGCAACCCCTGATCCCGCAGTGCCGCG  
TGTGTGAATAACGTCTTCCGATTGTAACGCACTTTCCACCGGTACCATCATGACAGTACCCGTAGAACAAGCCCCCGC  
TAACTTCCTGCCACCAGCCGCGGTAATACTAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGACTGACTGGGCCTACCCGGCGTGTAGG  
CCGTTTTGACCCCTCAGACGTTAAATCCCCAGGCTTAACCTGCTGAGCTGCGGTTGCCACCTTTAGACTATATTGTGAG  
ATACGGTTGTGCAATTCACTCTGTACAGGTGTAAATTTCTAGATGTGGCGAATAACACCCGTGGCGAAGGCGGCGATC  
TTCCTCATTACTGACGCTTACGCGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGCTACATCCCCTGATACTCCCCTCTATAAAC  
GATGTGTGATATATGTTCTGTAAATTATTTACTCCATCTTATAATTAACGCGTTGAGCGCCGCGCCGGGGTAGTCCC  
GCAGACAGGATTAAGACGCCCATACCATAGAAAAAGGCTCGAAAAATAATGGAAAAAATAAATAAAAAAACATTAA  
CAGACAGACGAGCAGAGAATTTAGCGGTCTG

**Com o primer AC3**

GGGGGGGGGGGAAAGCCAAAGAAAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGTGCTTAACGCGTTAACTGCGACAC  
TGAGTAATAAGTTACCCACATCTAGCACACATCGTTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC  
CCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTAATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCCAATATCTACAAA  
TTTCACCTCTACACAGGGAATTCACAACCCCTCTCTCACACTCTAGTCTTAACGTCTCAAATGCAGCTCCAGGTTAA  
GCCCCGGGATTTACATCTGACTGTCAAAACCGCCTACACGCCCTTTACGCCCAGTCATTCCGAGCAACGCAAGCCCC  
CTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTACGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGTCGAA  
AGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTACAATATTCCC  
CACTGCGGCCTCCCAAATGAGTCTGGGCCGGGTCTCAGTCTCAGTGTGGCGGAAAATCCTCGCGGAGAAGGTAGCTAT  
CTGCCCCCTTTGTAGGCCTTTAGCCAAGCAACGAGGGGAACAAAACGGGCTCCTCCCGCGGGTGACTTCCCGCTTAGAA  
CGGGGAGAGAGAGATTGTACACACACTATTTTATCACATTTACTATCCCACGGGACGCACCGCGGCGGAAACTTCAGT  
CGAACAGCAGAAGTGAAGACGCCCATACGCAGGCGAAAGTTGTAGTAGTTAACGAACATAGAAAAAACCCCTAAAAA  
AAGACGGAAACCCCCCG

## Anexo V – Resultados da Prova de Análise Sensorial

### a) Amostra

Sexo	
M	F
16	18
Total	<b>34</b>

Categorias de idades	Nº de indivíduos		
	M	F	Total
<21	4	0	4
21-24	3	5	8
25-34	4	4	8
35-44	2	3	5
45-54	3	2	5
55-64	0	1	1
>=65	0	3	3

### b) Resultados da Parte I – Prova Pareada de Preferência

Código da Amostra	Nº de respostas	%
<b>722</b>	29	85,3
<b>530</b>	4	11,8
(nulo)	1	2,9
Total	34	100

### c) Resultados da Parte II

#### Avaliação hedónica das características organoléticas das kombuchas

Amostra 722	Nº de respostas				
	Muito desagradável	Desagradável	Indiferente	Agradável	Muito Agradável
<b>Aspeto</b>	0	0	5	22	7
<b>Aroma</b>	0	9	13	7	5
<b>Sabor</b>	1	5	1	16	11
<b>Global</b>	1	3	4	19	7

Amostra 530	Nº de respostas				
	Muito desagradável	Desagradável	Indiferente	Agradável	Muito Agradável
<b>Aspeto</b>	0	1	8	23	2
<b>Aroma</b>	1	12	8	10	3
<b>Sabor</b>	2	18	4	9	1
<b>Global</b>	3	12	7	12	0

Intensidades dos diferentes atributos referentes ao aroma

Nº de respostas

Amostra 722	Não perceptível	Muito pouco	Pouco	Suficiente	Muito	Demasiado	(nulo)
Doce	7	3	7	12	4	0	1
Frutado	4	6	7	13	3	0	1
Floral	6	9	10	4	3	1	1
Avinagrado	1	1	7	10	11	4	0
Fermentado	9	2	7	10	5	0	1

Nº de respostas

Amostra 530	Não perceptível	Muito pouco	Pouco	Suficiente	Muito	Demasiado	(nulo)
Doce	8	7	11	8	0	0	0
Frutado	7	5	14	5	2	0	1
Floral	9	6	9	8	1	0	1
Avinagrado	2	2	4	11	11	4	0
Fermentado	6	3	3	15	5	1	1

Intensidades dos diferentes atributos referentes ao sabor

Nº de respostas

Amostra 722	Não perceptível	Muito pouco	Pouco	Suficiente	Muito	Demasiado	(nulo)
Doce	0	1	5	23	5	0	0
Ácido	2	2	5	18	6	1	0
Gás	13	8	8	5	0	0	0

Nº de respostas

Amostra 530	Não perceptível	Muito pouco	Pouco	Suficiente	Muito	Demasiado	(nulo)
Doce	7	8	12	7	0	0	0
Ácido	0	0	0	16	13	5	0
Gás	8	3	7	13	2	0	1

Intenção de compra das kombuchas apresentadas

Amostra	Nº de respostas				
	De certeza que não compraria	Provavelmente não compraria	Não sei se compraria	Provavelmente compraria	De certeza que compraria
722	4	4	6	16	4
530	9	9	10	6	0

## Anexo VI – Poster das Apresentações do Mestrado de Ciências Gastronómicas, Junho 2015

POWERED BY  
**PechaKucha**  
20 X 20  
IMAGES SECONDS  
PechaKucha.org  
DEIGNED & SHARED BY  
KLEIN DYTHAM ARCHITECTURE



### MESTRADO EM CIÊNCIAS GASTRONÓMICAS

Uma pitada de conhecimento torna tudo mais saboroso

**25 de Junho** | Pavilhão do Conhecimento *Ciência Viva Parque das Nações - Lisboa*

**10h - 13h**

**Susana Novais Santos** - A Neurociência da Cerveja  
**Carla Fritolli** - Capsicum - das Américas para o Mundo  
**Mário Rolando** - O Ensino da Panificação em Portugal  
**Potiguara Spindola** - História da Massa  
**Joana Pereira** - Polpas de Caju e Acerola Texturizadas - Desenvolvimento e Caracterização  
**Leonardo Rabite** - Especiarias na Conservação de Alimentos  
**Adriana Retamoza** - Licores  
**Miriam Santos** - Sobremesas sem Açúcar Resultantes de Fermentações  
**Juliana Adjafre** - Aromas e Temperos - Brasil e Portugal à Mesa  
**Pedro Monteiro** - Enchidos do Mundo - Fumagem como Método de Conservação

**14h30 - 17h30**

**Esteban Puebla** - Estudo de Novas Técnicas Culinárias  
**Bruno Sousa Leite** - Algas na Boca: Alimentação Ancestral e do Futuro  
**Catalina Salcedo** - A Ciência: o Melhor Aliado dos Cozinheiros Vegetarianos  
**Renata Bender** - Especiarias: suas Ações e Propriedades  
**Pedro Cruz Gomes** - Lisboa, Gastronomia de uma Cidade  
**Alfredo Pardal** - Neurogastronomia: Percepção de *Flavour*  
**Mafalda Santos** - Kombucha, uma "Panaceia" Exótica  
**Sónia Oliveira** - Flores Comestíveis: o Ingrediente  
**Gabriel Magalhães** - Pato no Tucupi, a Tradição no Círio de Nazaré  
**Patrícia Gabriel** - 1por3 como sempre se fez

**entrada livre**

**FCT** INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

 **INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA**  
Universidade de Lisboa

 **OBSERVATÓRIO DE LISBOA**

 **MUSEU DO CONHECIMENTO**  
Ciência Viva

 **FAV**  
Faculdade de Engenharia da Universidade Nova de Lisboa



INSTITUTO  
SUPERIOR DE  
AGRONOMIA  
Universidade de Lisboa

**Mafalda Santos**

**KOMBUCHA: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS  
PRODUTOS ALIMENTARES PARA USO EM RESTAURAÇÃO**

**2016**